

塩基性両親媒性薬物によるホスホリピドーシスの
発症メカニズムとバイオマーカー開発に関する基礎的研究

**A basic study on induction mechanism of phospholipidosis with
cationic amphiphilic drugs and biomarker development**

2015年

濱口 良平

目 次

緒 論	1
本 論	
第 1 章 DIPL 発症と後期エンドソームおよびリソソーム内 pH との関係	11
実験方法	12
第 1 節 pH 測定プローブの作製と評価	18
第 2 節 後期エンドソームおよびリソソーム内 pH に及ぼす CAD の影響	23
第 3 節 後期エンドソームおよびリソソーム内の酵素活性に及ぼす CAD の影響	30
小括	35
第 2 章 CAD と生体膜親和性に及ぼす BMP の影響	36
実験方法	38
第 1 節 CAD とリポソームとの親和性に及ぼす BMP の影響	41
第 2 節 CAD とリポソームとの親和性に及ぼす pH の影響	49
小括	54
第 3 章 DIPL の発症予測のためのバイオマーカーの探索	55
実験方法	56
第 1 節 CAD の細胞内リン脂質組成に及ぼす影響	64
第 2 節 DIPL の新規予測パラメータの構築と基礎的検討	75
小括	79
総 括	80
謝 辞	82
引用文献	83

略語表

AM	amiodarone
BAF	bafilomycin A1
BMP	bis(monoacylglycero)phosphate
BSA	bovine serum albumin
CAD	塩基性両親媒性薬物
CPZ	chlorpromazine
CIC	Cl ⁻ /H ⁺ 対向輸送体
DAG	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycerol
DDPC	1,2-didecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
dex	dextran
DHPC	1,2-diheptadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DiI-C18	Vybrant DiI cell labeling solution
DIPL	薬剤誘発性ホスホリピドーシス
DMPC	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DPPG	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerol
DPPS	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-L-serine
EDTA-2Na	ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt
FBS	ウシ胎児血清
HPCE/FA	キャピラリー電気泳動/先端分析法
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
LC-MS/MS	液体クロマトグラフィー—タンデム質量分析法
IMI	imipramine
LAMP2	lysosomal-associated membrane protein 2
LPLA ₂	リソソーム性ホスホリパーゼ A ₂
LysoSensor	LysoSensor Green DND-189
MALDI-TOF/MS	マトリクス支援レーザー脱離イオン化法—飛行時間型質量分析計
MON	monensin
NHE	Na ⁺ /H ⁺ 交換輸送担体
OG	Oregon Green 488

PC	ホスファチジルコリン
PE	ホスファチジルエタノールアミン
PG	ホスファチジルグリセロール
PI	ホスファチジルイノシトール
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PRO	propranolol
PS	ホスファチジルセリン
RIC	再構成イオンクロマトグラム
RPE	フィコエリスリン
SRM	selective reaction monitoring
TAM	tamoxifen
TMR	tetramethylrhodamine
TNBS	2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid sodium salt dehydrate
v-ATPase	vacuolar ATPase
WF	warfarin

緒 論

(1) 薬剤誘発性ホスホリピドーシス

薬剤誘発性ホスホリピドーシス (drug-induced phospholipidosis, DIPL) は、薬物によって引き起こされるリン脂質蓄積症である。DIPL の発症メカニズムは明らかになっていないが、塩基性両親媒性薬物 (cationic amphiphilic drug, CAD) によって引き起こされることが知られている。臨床現場において用いられている CAD は、アミオダロン、タモキシフェン、クロルプロマジン、イミプラミン、プロプラノロール、クロロキン等、数多く存在する。例えば、抗不整脈薬であるアミオダロンの投与は、肺にリン脂質を蓄積させ、咳や呼吸困難といった症状を引き起こすことがあり¹⁾、その他にも、肝炎、視覚障害といった副作用を引き起こすことが知られている²⁾。また、選択的エストロゲン受容体調節薬であるタモキシフェンの長期投与で、リン脂質とタモキシフェンの複合体が形成され、副腎²⁾や角膜³⁾に色素が沈着することが知られている。さらに、クロロキンがヒトでは、網膜症、筋疾患および脂肪肝を引き起こすこと、ラットでは、肝臓にリン脂質を蓄積させることが知られている¹⁾。このように、リン脂質の蓄積は特定の器官や組織にのみ生じるわけではなく、様々な器官や組織に起こり得る^{1,4)}。また、リン脂質の蓄積が生じる細胞も多様であるが、リンパ球やマクロファージなどに蓄積した例が多く^{5,6)}、クロロキンをはじめ多くの CAD が、肝細胞およびクッパー細胞のリソソーム内にリン脂質を蓄積させることが報告されている²⁾。

リン脂質は水相中で自発的に二分子膜を形成するため、単球やマクロファージの細胞内にリン脂質が過剰に蓄積すると、多重膜構造体 (ラメラ体) が形成される^{5,6)}。DIPL の診断は、組織生検によるラメラ体の確認によって行われる。イヌ腎臓由来の MDCK 細胞に 10 μ M のクロロキンを処置すると、4 時間後にはラメラ体の形成が認められることが報告されている⁷⁾。しかし、個体レベルでは、CAD の単回投与後ただちに咳や呼吸困難のような症状が認められることはほとんどなく、長期にわたる反復投与によって症状が現れることが多い。例えばアミオダロンを服用すると、肺にリン脂質が蓄積し、致死的な間質性肺炎や肺胞炎を発症することもある。しかし、DIPL の発症メカニズムが未解明であるため、治療において、根本的な原因に対する直接的な働きかけは困難である。さらに、CAD の投薬を中止することによってラメラ体が

消失し、症状が回復することが経験的に知られているため、治療法としては、CADの休薬と臨床症状に対する対症療法が一般的に選択される。一方、重度の不整脈でアミオダロンの投与を継続しなければならない場合など、休薬が困難なこともある。したがって DIPL の発症メカニズムを解明し、臨床症状の発現をコントロールできるようになることが求められている。DIPL の診断は、組織切片を採取し、ラメラ体が増加しているかどうかを電子顕微鏡によって確認することで行われる。この検査における患者の負担は小さいとはいえず、また、検査によって DIPL が確定したとしても治療法が変わらないことから、検査の意義としては必ずしも十分とはいえず、検査そのものを実施しない場合も多い。DIPL の発症メカニズムが解明され、組織生検より簡便に検査が可能で、症状が発現する前に発症を予測できるようなバイオマーカーが開発されるならば、検査における患者負担の軽減や、投与設計の最適化による効果的な副作用制御が実現する可能性も生じてくる。

(2) 細胞内のリン脂質輸送：メンブレントラフィック

リン脂質の生合成は、まずミトコンドリア外膜および小胞体外膜においてグリセロール三リン酸から、ペルオキシソームにおいてジヒドロキシアセトンリン酸からそれぞれリゾホスファチジン酸が生合成されることに始まる。このリゾホスファチジン酸に小胞体外膜においてアシル CoA が付加され、リン脂質の前駆体であるホスファチジン酸が得られる。その後、小胞体外膜でホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルイノシトール (PI) およびホスファチジルセリン (PS) が、ミトコンドリア内でホスファチジルグリセロール (PG) が生合成される⁸⁾。また、生合成されたリン脂質からリモデリング反応によってもリン脂質が合成される⁸⁾。さらに、後期エンドソームおよびリソソームの生体膜には、一般の生体膜とは異なり、酸性リン脂質である bis(monoacylglycero)phosphate (BMP) が多く含有されていることが知られている⁹⁻¹¹⁾。BMP は、他のリン脂質と異なる経路で PG から生成され、BMP を生成する過程においてグリセロールの転位が生じることが明らかになっている¹²⁾。一般に、生体内のリン脂質には、リン酸基およびアシル基と結合するグリセロールは *sn*-3 型のものしか存在しない。この *sn*-1 型か *sn*-3 型の違いは、酵素の基質選択性を決定する上で重要な因子であり、後期エンドソームおよびリソソームにおいて、BMP が豊富に含まれる一因ではないかと考える。BMP は、組織中での含有量は全リン脂質中で 1% にも満たないにもかかわらず、後期エン

ドソームには約 15%含有されているという報告^{9,10)}や、リソソームに主に含有されているという報告がある¹¹⁾。このような経路で合成されたリン脂質は、小胞輸送や可溶性タンパク質を介した輸送により各オルガネラに輸送され、細胞膜の基本骨格や、タンパク質の細胞内輸送、外因性物質取り込み（エンドサイトーシス）時の小胞膜の構成等に利用される。

リン脂質二分子膜からなる小胞を介した輸送は、メンブレントラフィックと呼ばれ、細胞内における物質輸送に重要な役割を果たしている。メンブレントラフィックの一つに、エンドサイトーシスから始まる一連の細胞内輸送経路がある。エンドサイトーシスは、細胞外の物質を細胞内に取り込む過程であり、リン脂質二分子膜に包まれた小胞（エンドソーム）を形成する。LDL¹³⁾やトランスフェリン¹⁴⁾が細胞膜上の受容体に結合すると、クラスリンというタンパク質が受容体近傍の細胞膜を覆う様に結合する。その後、クラスリンで覆われた細胞膜が受容体に結合した物質を取り込むように細胞内部へと凹み、クラスリン皮膜小胞が形成される。このような過程を、クラスリン依存性エンドサイトーシスという¹⁵⁾。一方、アルブミンは、クラスリンの代わりにカベオリンというタンパク質が関与するカベオラ依存性エンドサイトーシスによって取り込まれることも明らかになっている¹⁶⁾。このようにして取り込まれたエンドソームは、まず早期エンドソームと融合する。この過程で、クラスリン、カベオリンの両タンパク質は小胞から分離し、細胞膜近傍において次のエンドサイトーシスに使用される。早期エンドソームは別名ソーティングエンドソームとも呼ばれ、取り込まれた物質の正しい輸送先を決定するオルガネラである。ここで、LDL 受容体やトランスフェリン受容体等の膜タンパク質は、細胞膜へと戻る経路であるリサイクリングエンドソームに輸送され、細胞膜へと返される。一方、細胞内において不要になった物質は、後期エンドソームへと輸送され、細胞内での物質代謝を行うオルガネラであるリソソームと融合し、分解される。リン脂質は、各種のホスホリパーゼによって分解されるが、リソソーム内にもリソソーム性のホスホリパーゼ A₂ (LPLA₂) の存在が明らかになっている¹⁷⁾。

一方、エンドサイトーシスの過程において、エンドソーム内の pH 環境が大きく変化することが知られている¹⁸⁾。細胞外液、細胞質基質の pH は 7.4~7.0 程度の中性であるのに対し、早期エンドソームやリサイクリングエンドソームでは、pH が 6.5 程度の弱酸性であり、さらに、後期エンドソームでは 6.0 程度、リソソームでは 5.5 程

度から 5.0 以下まで酸性化されている¹⁸⁾。このような pH の酸性化は、オルガネラ膜上に存在するプロトン輸送担体である vacuolar ATPase (v-ATPase) によるプロトンの取り込みと、 Na^+/H^+ 交換輸送担体 (NHE) による過剰なプロトンのリークによって調節されていること、および、pH 調節に伴って発生する膜内外の電位差が、 Cl^-/H^+ 対向輸送体 (CIC) によって解消されていることが明らかになっている¹⁸⁻²³⁾。その模式図を Fig. 1 に示す。また、このエンドサイトーシスの過程における、オルガネラの酸性化が、メンブレントラフィックや、細胞内の物質輸送、リソソーム酵素の活性に重要であると指摘されている^{1,18)}。

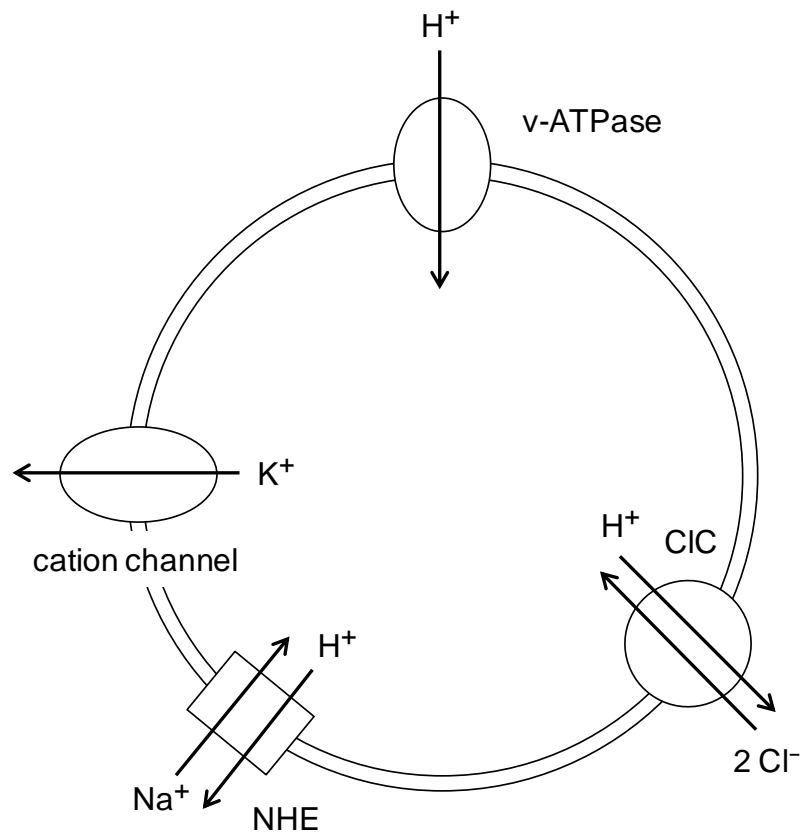


Fig. 1 酸性オルガネラの pH 維持機構

v-ATPase: プロトンを能動的にオルガネラに取り込み, 内腔の酸性化に寄与.

NHE: 過剰のプロトンをナトリウムとの交換輸送によってオルガネラ外に排出する.

ClC: プロトン取り込みによって生じた電位差を解消するために, 1 分子のプロトンと 2 分子の塩化物イオンを交換輸送する.

cation channel: 電位差の解消のためにカリウムイオンを排出する.

(3) CAD の酸性オルガネラ指向性

現在、臨床現場で使用されている薬物の多くが両親媒性化合物である。この性質は、薬物が細胞膜を透過する過程と、血液等の組織液中を輸送される過程において重要である。さらに、イオン性物質の溶解性が、溶媒の pH によって大きく変化することはよく知られている。塩基性物質では、塩基性の溶媒中で分子形分率が増加するため水溶性は減少し、酸性溶媒中ではイオン形分率の増加により水溶性が上昇する（pH 分配仮説）。pH の異なる 2 つの水相がリン脂質二分子膜で隔てられているとき、塩基性の弱電解質は pH 分配仮説に従い、pH がより低い水相に多く集積する。このことから、細胞内に取り込まれた CAD は、細胞質基質より pH が低くなっているエンドソーム経路や、ゴルジ体（pH 6.5 程度）に多く集積すると考えられる²⁴⁻²⁶⁾。特に、pH の低下が顕著なオルガネラであるリソソームには高濃度の CAD が蓄積していることが考えられる。実際、細胞に処置されたイミプラミンが、速やかにリソソームに集積すること²⁵⁾、100 μ M のクロロキンを細胞に処置したときの、リソソーム内のクロロキン濃度が 114 mM まで上昇すること²⁶⁾、キナクリンがリソソームに集積すること²⁷⁾等が報告されている。さらに、CAD が蓄積した酸性オルガネラの pH はもとの状態より上昇することも報告されている^{25,26,28,29)}。特にリソソームは様々な酵素を有しており、異物の消化に重要な役割を担っているが、CAD の流入によって水相の pH が上昇すると、酵素の至適 pH と合致しなくなり、酵素活性が低下すると予想される。リソソームにはリン脂質分解酵素も含まれており、CAD の流入に伴いリン脂質分解酵素の活性が低下し、DIPL が発症すると考える仮説がある¹⁾。ラメラ体は主にリソソームに形成され³⁰⁾、また、CAD の処置によって培養細胞中の酸性オルガネラ内の pH が上昇することを、過去の研究結果が示しているため、この説は証明されたとはいえないものの、一般に受け入れられている。

(4) CAD とリン脂質との関係

CAD は、生体膜と強く相互作用することが報告されている³¹⁻³⁵⁾。これには、CAD が持つ正電荷と、リン脂質のリン酸基が持つ負電荷との間の静電相互作用と、疎水性部分どうしの疎水性相互作用が関係していることが明らかになっている³¹⁻³⁴⁾。また、分子動力学計算の結果から、CAD の疎水性基とリン脂質二分子膜の疎水性コアとが相互作用し、CAD のカチオン性解離基とリン脂質のリン酸基とが静電相互作用する配置で結合するモデルが提唱されている³⁴⁾。このモデルに従えば、CAD とリン脂質

二分子膜との相互作用の強さは、リン脂質の極性頭部の電荷の影響を受けると予想される。既報においても、酸性リン脂質である PS や PG の含有率が高いリン脂質二分子膜は、中性リン脂質である PC からなるリン脂質二分子膜よりも、CAD との結合能が増大する結果が得られている³¹⁻³⁴⁾。さらに、後期エンドソームまたはリソソームを形成する原形質膜におけるリン脂質の組成は、一般的な生体膜とは大きく異なり、BMP が多く含まれていることは先に述べた。この BMP もまた酸性リン脂質であることから、BMP が局在する後期エンドソームまたはリソソームの原形質膜に対して、CAD は強く結合すると予想される。上述のように、CAD は酸性オルガネラの内水相に多く集積する傾向があるが、それに加えて、後期エンドソームまたはリソソームの原形質膜に、酸性リン脂質である BMP が豊富に含まれていることを併せて考慮すると、後期エンドソームまたはリソソームにおいては、水相とリン脂質二分子膜（およびラメラ体）のどちらにも CAD が集積しやすい性質があると考えられる。しかし、CAD とリン脂質との結合に BMP がどのような効果を与えているのかを実験的に確認した報告はない。

一方、CAD がリン脂質分解酵素である各種のホスホリパーゼを阻害することが、過去の阻害実験から明らかになっている^{1,37,38)}。CAD によるホスホリパーゼの阻害様式が、競合的、非競合的、あるいはそれらの複合的な阻害かは、CAD や酵素の種類によって異なる。CAD が酵素を競合阻害する場合には、原理上、CAD は酵素の活性中心において、酵素と複合体を形成する。このとき、複合体の形成が CAD の分子構造に依存することになるため、多様な分子構造をもつさまざまな CAD が、一様にホスホリパーゼの活性中心と選択的に相互作用し、基質と競合するとは考えにくい。これに対し、非競合的阻害が生じている場合には、CAD が酵素の活性中心以外の部分と特異的または非特異的に複合体を形成し、酵素活性を低下させると考えられる。例えば、アミオダロンは種々のホスホリパーゼを競合阻害するが¹⁾、プロプラノロール、クロルプロマジン、イミプラミンは非競合的に阻害すると報告されている³⁶⁾。また、クロロキンは、ラット肝リソソーム由来のホスホリパーゼ A₁ による PC の分解を競合的に阻害するが³⁷⁾、ブタ膵臓由来のホスホリパーゼ A₂ による PC の分解を非競合的に阻害する³⁶⁾。一方、プロプラノロール、クロルプロマジン、イミプラミンをはじめとする多くの CAD はリン脂質二分子膜と結合することが知られている³⁸⁾。CAD と結合した状態にあるリン脂質が、リン脂質分解酵素の基質となり得るかどうかは明

らかではないが、もしそれが基質とならず、かつ CAD がリン脂質と酵素との親和性に影響を及ぼさない場合には、リン脂質への CAD の添加は正味の基質濃度を減少させ、見かけ上は競合阻害として観測されることになる。しかし、CAD と結合したリン脂質が酵素の基質となる可能性や、CAD がリン脂質と酵素との親和性に影響を及ぼす可能性は否定できない。このようなときには、見かけ上は複雑な阻害様式として観測されることになる。このように、多種多様な CAD がリン脂質分解酵素の活性を阻害するメカニズムは複数あり、見かけ上の阻害様式が競合的、非競合的、またはそれらの複合的阻害になるのかは、着目している酵素、リン脂質および CAD の組合せにおいて生じる、各阻害メカニズムの程度によると考えられる

(5) DIPL 研究の現状と本研究の目的

DIPL の発症要因は不明であるが、現在までに、リン脂質の分解抑制^{37,39,40)}、メンブレントラフィックの抑制¹⁸⁾、オートファジーの亢進⁴¹⁾の3つの仮説が提唱されている。前述のように CAD は細胞に取り込まれると、速やかに酸性オルガネラに取り込まれ、リソソームのような酸性オルガネラ内の pH を上昇させることが報告されている^{25,26,28,29)}。さらに、分泌型のホスホリパーゼ A₂ や LPLA₂ が CAD によって拮抗的または非拮抗的に阻害される^{37,39,40)}ことや、CAD がリン脂質と強く相互作用することも報告されている³¹⁻³⁵⁾。これらの現象はいずれもリン脂質の分解を抑制する方向に働きうることから、DIPL の発症に関係していると推測されている。

CAD が酸性オルガネラ内の pH を上昇させると、エンドサイトーシスから始まる輸送経路内の pH 勾配に異常が生じる。このため、メンブレントラフィックや物質の輸送に異常が生じ、リン脂質が蓄積する可能性が指摘されている¹⁸⁾。さらに、CAD 処置がオートファジーに影響を及ぼすことも報告されている^{42,43)}。オートファジーは、真核生物の細胞内で生じる自食作用であり、細胞内の不要な物質を小胞内に隔離する過程をさす。この隔離過程により形成されたオートファゴソームはリソソームによって処理される。最近の研究から、何らかの原因で傷害が生じたリソソームもオートファジーによって小胞に隔離され、正常なリソソームによって分解されることが明らかになった⁴⁴⁾。この過程に CAD が影響を及ぼすことから、DIPL との関連性が指摘されている。このように、DIPL の発症メカニズムに関する研究が数多く実施され、多くの情報が得られているが、まだ解明には至っていない。

CAD が酸性オルガネラの pH を上昇させるという報告は多い^{25,26,28,29)}が、一方で、

最近の Zheng らの論文⁷⁾によると、MDCK 細胞に 50 μ M のクロロキンを処置した場合に、リソソーム内の pH が上昇していないことが報告されている。また、Kornhuber らも同様に⁴⁵⁾、SY5Y 細胞にアミトリプチリンを処置したときに pH が上昇していないことを報告している。これらの結果は従来の報告とは逆であるが、そのことについて考察はなされておらず、詳しいことは何もわかっていない。さらに、酸性オルガネラ内の pH 上昇が DIPL と関係していると言われているものの、細胞内にリン脂質が過剰に蓄積した状態における、後期エンドソームやリソソーム内腔の pH を測定した例はない。仮に CAD によってリソソーム内の pH が上昇し、リン脂質分解酵素の活性が低下するのであれば、類似の至適 pH をもつ他のリソソーム酵素にも影響が生じる可能性がある。そこで本研究の第 1 章では、DIPL 発症前と発症時における酸性オルガネラ内の pH に及ぼす CAD の影響を明らかにするとともに、リソソーム酵素の活性に及ぼす CAD の影響を検討した。

次に、酸性オルガネラの膜には BMP が多く含まれる⁹⁻¹¹⁾。BMP は PG の構造異性体であることと、一般に酸性リン脂質が CAD と生体膜との親和性を増強させることを考慮すると、CAD は酸性オルガネラにおいて、膜と強く相互作用することが予想される。しかし、これまで BMP が CAD の生体膜への結合性に与える影響について検討した報告はない。そこで本研究の第 2 章では、BMP が CAD の生体膜への結合性に与える影響を明らかにすることを目的とした。

一方、DIPL のバイオマーカーに関する研究も盛んに行われている。先述のように、DIPL の診断は、生検によるラメラ体の確認によって行われるのが現状である。この方法は、時間、コスト、身体的侵襲性が大きいため、より簡便で信頼性の高いバイオマーカーが求められている。これまでに、フェニルアセチルグリシン⁴¹⁾、シトクロム P450 等の遺伝子群の発現変動⁴⁷⁻⁴⁹⁾、BMP^{50,51)} がバイオマーカー候補として報告されている。これらのバイオマーカー候補のうち、フェニルアセチルグリシンや遺伝子群の変異はそれ自身がリン脂質ではなく、リン脂質の変動との関連性が明らかではない。このことから、フェニルアセチルグリシンや遺伝子群の変異が、リン脂質の変動に伴う何らかの代償反応に基づいたサロゲートマーカーである可能性が残されている。そのため、DIPL のマーカーとして使用するためには、DIPL に対する特異性を十分に確認する必要がある。一方、それ自身がリン脂質である BMP の変化は、DIPL のエンドポイントに近いバイオマーカーであると考えられる。BMP の分析には、液

体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) を用いるのが一般的である。しかしながら、BMP は体内において微量成分であるため、高感度かつ高精度で分析することは必ずしも容易とは言えない。そのため、BMP に代わる新たなバイオマーカーが望まれている。そこで本研究の第 3 章では、DIPL の新規リン脂質バイオマーカーの探索を行った。

本論文の第 1 章では、pH によって蛍光強度が変化する蛍光色素を用いて、CAD 処置直後およびリン脂質蓄積時における培養細胞のリソソーム内 pH を測定した結果と、CAD 処置後のリソソーム内タンパク質分解酵素の活性を評価した結果について詳述する。第 2 章では、BMP 含有リポソームと CAD との親和性および親和性に影響する因子についてキャピラリー電気泳動/先端分析法を用いて評価した結果について詳述する。第 3 章では、LC-MS/MS を用いて、CAD 処置前後の細胞内のリピドームを解析し、リン脂質の過剰蓄積と関連する変化を探索して得られた、DIPL のバイオマーカー候補となるパラメータについて詳述する。

本 論

第 1 章 DIPL 発症と後期エンドソームおよびリソソーム内 pH との関係

DIPL の発症メカニズムは未解明であるが、これまでいくつかの仮説が提唱されている。なかでも、CAD が、①リソソーム内の pH を上昇させること^{25,26,28,29)}、②リン脂質分解酵素を拮抗的または非拮抗的に阻害すること^{37,39,40)}、③リン脂質と強く相互作用すること³¹⁻³⁵⁾、によって、リン脂質分解酵素によるリン脂質の代謝を抑制するために、リン脂質の蓄積が生じる、という説が有力視されている。リン脂質を分解する酵素の一つに、LPLA₂ が知られている¹⁷⁾。LPLA₂をはじめ、リソソーム内に存在する酵素は pH 5 前後の酸性条件下に至適 pH を持つ⁵²⁾ことから、CAD 処置によってリソソーム内の pH が上昇するとリソソーム酵素の活性が低下すると考えられている。リソソーム酵素には、リン脂質以外の代謝に関わるものも含まれており、リソソーム内腔の pH が上昇すると、リン脂質のみならず他の多くの物質の代謝にも影響が生じる可能性がある。しかし、今のところ、そのような報告は存在していない。さらに、近年では CAD がリソソーム内の pH を上昇させていないという結果も報告されてきている^{7,45)}。これらの報告は、CAD 処置に伴う pH の上昇が、リソソーム内にリン脂質が蓄積する原因ではない可能性を示唆していると考えられる。また、CAD 処置によってリン脂質が蓄積した状態におけるリソソーム内の pH を評価できれば、仮説の妥当性を判断するのに大きく役立つ。

そこで本章では、CAD として塩基性と両親媒性がともに強く、かつ細胞毒性が強すぎない薬物であるクロルプロマジンを用い、正常時またはリン脂質が過剰に蓄積した状態における後期エンドソームおよびリソソーム内の pH に及ぼす影響について、pH 応答性蛍光プローブを作製し検討した。なお、モデル細胞としては、DIPL によるリン脂質過剰蓄積の観測例が多いマクロファージ系の細胞を用いることにし、マウス腹腔マクロファージ由来の RAW264 細胞を使用した。この細胞は、医薬リード化合物のホスホリピドーシス誘発能スクリーニングにもよく用いられている⁵³⁾。本章ではさらに、正常細胞の後期エンドソームおよびリソソーム内のタンパク質分解酵素の活性に対する影響についても検討した。

実験方法

(1) 試薬

Monensin (MON) sodium salt (> 90%), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, > 99%), RPMI1640 および bovine serum albumin (BSA) は, 和光純薬工業 (大阪, 日本), chlorpromazine (CPZ) hydrochloride (> 98%) および bafilomycin A1 (BAF, > 90%) は, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した. Oregon Green 488-dextran conjugate (OG-dex), LysoSensor Green DND-189 (LysoSensor), Vybrant DiI cell labeling solution (DiI-C18) および tetramethylrhodamine (TMR) -5-(and-6)-isothiocyanate は Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), Anti-mouse CD107b (lysosomal-associated membrane protein 2, LAMP2) antibody labeled with phycoerythrin は GenWay Biotech (San Diego, CA, USA) より購入した. なお, 本実験で使用した試薬および薬物を, Fig. 2 に示す.

(2) 細胞培養

細胞には, マウス腹腔マクロファージ由来の RAW264 細胞を選択した. RAW264 細胞は, 理化学研究所バイオリソースセンター (筑波, 日本) より購入した. ペニシリン (100 Unit/mL) /ストレプトマイシン (100 µg/mL) (Invitrogen), 10% ウシ胎児血清 (FBS) およびフェノールレッドを含有した RPMI1640 培地を用いて, 37 °C, 5% 二酸化炭素気流下にて培養した. 継代操作は, 3 または 4 日毎に常法により行った.

(3) 蛍光プローブの作製

細胞内の pH を測定するための蛍光プローブは, Haggie らの方法⁵⁴⁾を参考にして, 作製した. OG-dex (4 mg/mL) と, TMR-isothiocyanate (10 mg/mL) を, 0.1 M の炭酸水素ナトリウム溶液 (pH 9.0) 中で混合し, 遮光下, 室温で 1 時間反応させ OG-dex-TMR を得た. OG-dex のデキストラン部分は, isothiocyanate と反応するリシン残基を有しているため, OG-dex に TMR が結合する. 反応後, 酢酸セルロースの透析膜 (透過分子量: 10,000 以下) を用いて一晩透析し, さらに, PD-10 column (Sephadex TMG-25 M, GE Healthcare UK, Buckinghamshire, UK) を用いて, サイズ排除クロマトグラフィーを行い, 未反応の TMR-isothiocyanate を除去した. また, 細胞内のタンパク質分解酵素の活性を評価するための蛍光プローブは, Humphries らの方法⁵⁵⁾を参考に作製した. BSA (9 mg/mL) と TMR-isothiocyanate (4 mg/mL) を, 上記と同様の方法で反応させ BSA-TMR を得た.

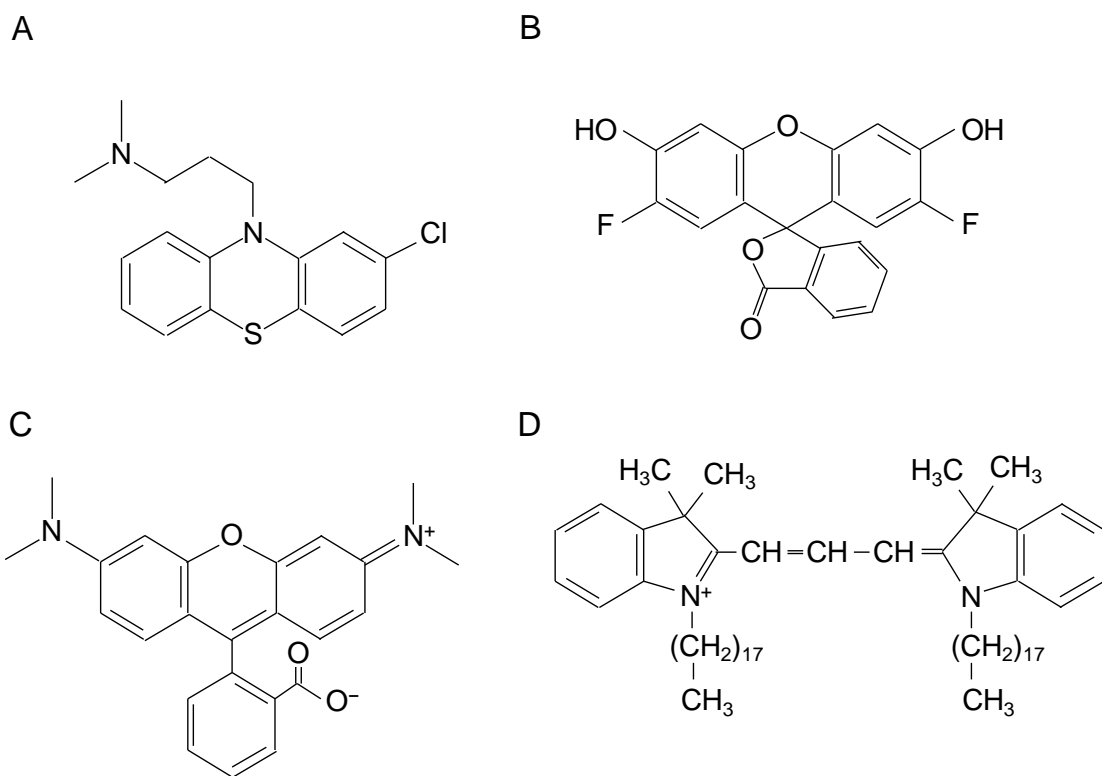


Fig. 2 第1章に使用した試薬および薬物

(A) CPZ, (B) OG, (C) TMR, (D) DiI-C18.

(4) タンパク質濃度の定量

細胞内の総タンパク質量は、Modified Lowry Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて定量した。細胞を、シリコンスクレイパーを用いて dish から剥がして回収し、遠心分離により培養液を除去した。得られた細胞塊を生理食塩水で懸濁し、測定試料とした。試料を 96 well プレートに入れ、マイクロプレートリーダー (Sunrise Remote, テカンジャパン, 川崎, 日本) を用いて 620 nm における吸光度を測定した。検量線は、BSA (1~1500 $\mu\text{g/mL}$) を用いて作成した。

(5) リン脂質濃度の定量

細胞を、培養皿からシリコンスクレイパーで剥離後回収し、遠心分離により培養液を除去した後、生理食塩水で懸濁した。細胞懸濁液からの脂質抽出方法は、Folch 法を参考に次のように行った⁵⁶⁾。細胞懸濁液 500 μL に、クロロホルム：メタノール (2 : 1) 溶液を 5 mL 加え攪拌し、2500 rpm で 5 分間遠心分離した。得られた上層を別のガラススピッツ管に移し、クロロホルム：メタノール (1 : 2) 溶液を 2 mL と生理食塩水を 1 mL 加え攪拌し、2500 rpm で 5 分間遠心分離した。上層を除去後、1 回目と 2 回目の下層および、生理食塩水を 1.5 mL 加え攪拌後、2500 rpm で 5 分間遠心分離した。上層を除去し、窒素ガスを用いて下層を蒸発させることで、脂質抽出物を得た。

脂質抽出物中のリン濃度を、Fiske-Subbarow 法⁵⁷⁾ によって定量した。47%硫酸を脂質抽出物に加え、150 $^{\circ}\text{C}$ で 3 時間反応させた。次に、過酸化水素水を加え 110 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間反応させた。反応溶液を十分に冷却した後、0.22%モリブデンアンモニウム水溶液を加え、さらに、Fiske-Subbarow 試薬 (1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid, sodium sulfite および sodium bisulfite の混合試薬) を直後に添加し、良く攪拌した後、混合溶液を 100 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分間反応させた。反応溶液の 830 nm での吸光度を、V530 紫外可視分光光度計 (日本分光, 東京, 日本) を用いて測定した。リン濃度の検量線は、リン酸二水素カリウム溶液 (0.2~4.0 $\mu\text{g/mL}$) を用いて作成した。

(6) CPZ 濃度の定量

CPZ (10 μM) を処置した細胞懸濁液 500 μL をガラス管に取り、0.5 M のリン酸水素二ナトリウム水溶液を 500 μL 加え、10 分間超音波照射し、細胞を破壊した。次に、3 mL のジイソプロピルエーテルを加え激しく攪拌し、3,000 rpm で 10 分間遠心分離した。得られた上層を新しい試験管に移し、窒素ガスを用いて完全に蒸発させた。抽出物をアセトニトリル：メタノール (1:1) 溶液 250 μL に溶解させ、高速液体クロ

マトグラフィー (HPLC) -UV 法により CPZ 含量を定量した。分析には, Chemcosorb 3-ODS-H カラム (2.1×100 mm) を用い, メタノール : 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.5) = 1:1 溶液を移動相に, カラム温度 40 °C, 流速 0.3 mL/min で分析した。検量線は, 細胞懸濁液に濃度既知の CPZ (10~100 μM) を添加し, 同様の抽出操作により得た試料を用いて作成した。

(7) 細胞内リン脂質局在の確認

FBS と膜染色剤である DiI-C18 を 200:3 の比率で混合し 37 °C で 19 時間以上放置した。次に FBS と DiI-C18 の混合溶液を RPMI1640 培地に 1:10 の比率で混合し DiI-C18 含有 RPMI1640 培地を作成した。細胞の培養液を, 作成した DiI-C18 含有 RPMI1640 培地に変更し, CPZ (10 μM) を添加した。CPZ 処置後 23 時間の時点で, 培養液を CPZ (10 μM) およびリソソーム染色剤の LysoSensor を含有した培地に変え, さらに 2 時間培養した。その後, 培養液をフェノールレッド非含有の培地に交換し, さらに 1 時間培養した。以上の操作により, リン脂質およびリソソームが染色された細胞を作製し, 共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (C1 Spectral Imaging System, ニコン, 東京, 日本) により細胞内の蛍光の局在を観察した。2 色の蛍光の重なり度合いは, Manders の共局在係数を, ImageJ により算出し評価した⁵⁸⁾。

$$\text{共局在係数} = \frac{\sum_i S1_i \cdot S2_i}{\sqrt{\sum_i (S1_i)^2 \cdot \sum_i (S2_i)}}$$

S1 : ピクセル i 中の赤色蛍光強度, S2 : ピクセル i 中の緑色蛍光強度

(8) 電子顕微鏡画像の撮影

スライドグラスチャンバー上で CPZ (10 μM) を 24 時間処置し培養した RAW264 細胞に, 2% グルタルアルデヒドおよび 2% パラホルムアルデヒド含有リン酸緩衝液を 1 時間処置し, 細胞を固定した。その後, リン酸緩衝液で細胞を洗浄し, 4 °C で 30 分, 1% 四酸化オスミウム含有リン酸緩衝液で処理した。エタノールを用いて細胞を乾燥し, Epon 樹脂 (TAAB Laboratories Equipment, Berkshire, UK) に埋没後, Leica EM UC6 ultramicrotome (Vienna, Austria) 上でダイヤモンド・ナイフ (Diatome, Bienne,

Switzerland) を用いて厚さ 60 nm の薄片を作製した。作製した薄片を銅の格子の上に置き、4%酢酸ウラニルおよび 0.3%クエン酸鉛で染色し、観察試料とした。作製した試料は、H-7650 電子顕微鏡（日立ハイテクノロジーズ、東京、日本）を用いて観察した（加速電圧、80 kV）。

(9) OG-dex の細胞内局在部位の確認

ガラスボトムディッシュに培養した RAW264 細胞に、OG-dex (0.01 mg/mL) を添加し、細胞内に取り込ませた。OG-dex 処置 2 時間経過後、OG-dex を含まない培養液に交換しさらに 1 時間培養した。CPZ を 23 時間処置した細胞に OG-dex を取り込ませる場合においては、OG-dex の処置時間を 5 時間に延長した。次に、OG-dex を取り込んだ細胞に、4%パラホルムアルデヒド含有等張化リン酸緩衝液 (PBS, 9.5 mM, pH 7.4) を 10 分間処置した。続いて、BSA 含有 PBS を 10 分間処置し、さらに、0.1% Triton X-100 含有 PBS を 3 分間処置した。固定し膜透過性を向上させた細胞に、フィコエリスリンで標識した、抗マウス LAMP2 抗体 (20 µg/mL) を添加し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した。2 色の蛍光の重なり度合いは、Manders の共局在係数を、ImageJ により算出し評価した⁵⁸⁾。

(10) 後期エンドソームおよびリソソーム内 pH の測定

(9) と同様の方法で RAW264 細胞に OG-dex-TMR (0.01~0.1 mg/mL) を取り込ませた。OG-dex-TMR を取り込んだ細胞の培養液を、20 mM クエン酸緩衝液含有 RPMI1640 (pH 7.4) に交換し、薬物または溶媒を添加後、共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した。Z 軸（深度軸）方向に細胞の上から下まで 20 枚の画像を撮影し、その蛍光強度の和から、細胞内の蛍光強度を求めた。任意に 5 つの細胞を選択し、515 / 30 nm (OG) および 605 / 75 nm (TMR) における蛍光強度の和を求め、蛍光強度比 OG/TMR を算出した。同時に、OG-dex-TMR を取り込んだ細胞の培養液を、50 µM MON 含有、20 mM クエン酸含有 RPMI1640 (pH 4.0~6.0) に交換した場合についても、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて観察した。この時得られた OG/TMR から検量線を作製し、薬物または溶媒処置時の後期エンドソームおよびリソソーム内 pH を算出した。

(11) リソソーム内酵素活性の評価

ガラスボトムディッシュに培養した RAW264 細胞に、OG-dex (0.02 mg/mL) を添加し、細胞内に取り込ませた。OG-dex 処置 2 時間経過後、BSA-TMR (80 µg/mL)

含有 RPMI1640 培地に交換しさらに 1 時間培養した。OG-dex および BSA-TMR を取り込んだ細胞の培養液を RPMI1640 に交換し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて 5 分間撮影した。2 色の蛍光の重なり度合いは、Manders の共局在係数を、ImageJ により算出し評価した⁵⁸⁾。深度軸方向に細胞の上端から下端まで 20 枚の画像を撮影し、その蛍光強度の和から、細胞内の蛍光強度を求めた。任意に 5 つの細胞を選択し、515 / 30 nm (OG) および 605 / 75 nm (TMR) における蛍光強度の和から蛍光強度比 TMR/OG を算出し、酵素活性を評価した。

第1節 pH 測定プローブの作製と評価

実験結果・考察

(1) プローブの設計

後期エンドソームおよびリソソーム内の pH 測定には、pH 応答性の蛍光色素である Oregon Green 488 (OG) の dextran (dex) コンジュゲートに pH 非応答性の蛍光色素である tetramethylrhodamine (TMR) を結合させた OG-dex-TMR を作製し用いた。dex は、細胞に受容体非依存的エンドサイトーシスにより取り込まれ、後期エンドソームおよびリソソームに到達する。そのため、dex に蛍光色素を結合させることで、後期エンドソームおよびリソソームに色素を取り込ませることが可能である^{54,59)}。また、取り込み量による蛍光強度の強弱を補正するために、蛍光強度が pH に依存しない TMR を dex に結合させ OG の蛍光強度と TMR の蛍光強度の比 (OG/TMR) を用いて pH を評価することとした。

(2) OG/TMR の pH 依存性の検討

OG-dex-TMR の蛍光強度比 OG/TMR と pH との相関性について蛍光分光光度計 (RF-540, 島津製作所, 京都, 日本) を用いて評価した結果を Fig. 3 に示した。励起スペクトル上の 500 nm 付近のピークが OG 由来, 555 nm 付近のピークが TMR 由来の蛍光であり, 各 pH に調整したクエン酸緩衝液中において異なるピークの形状が観察された (Fig. 3A)。それぞれのピークの高さを計測し算出した OG/TMR とクエン酸緩衝液の pH との関係を図 3B に示した。pH が 4.0 から 6.0 の範囲において OG/TMR と pH の間に良好な直線関係 ($r = 0.991$) が得られていることが確認できた。さらに蛍光色素は一般に高濃度になると、蛍光強度と濃度の間の線形性が失われ蛍光強度の低下が生じる可能性がある。そこで、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて、蛍光の濃度消光の有無について検討した。Fig. 4 には、OG と TMR の蛍光強度と濃度の関係を示した。その結果、OG および TMR とともに 0.78~100 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で蛍光強度は良好な直線性を示し (OG : $r = 0.998$, TMR : $r = 0.999$)、濃度消光は認められなかった。

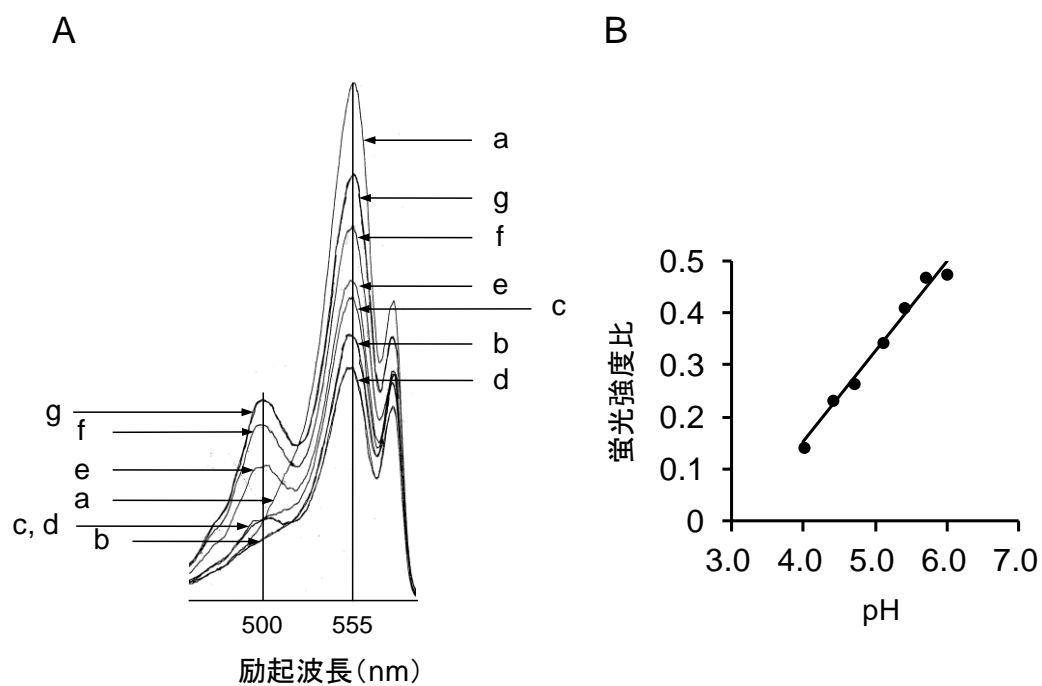


Fig. 3 OG-dex-TMRの励起スペクトルと蛍光強度比のpH 依存性の検討

A: 励起スペクトル

B: 励起スペクトルのピーク高さの比と pH の関係

OG-dex-TMR の濃度は 1 $\mu\text{g/mL}$, 蛍光波長は 580 nm, 励起波長幅は 450~600 nm, クエン酸緩衝液 (pH 4.0:a, 4.4:b, 4.7:c, 5.1:d, 5.4:e, 5.7:f, 6.0:g) に溶解し, 蛍光分光光度計 (RF-540) で測定した, B: 縦軸はピーク高さの比, 横軸は pH.

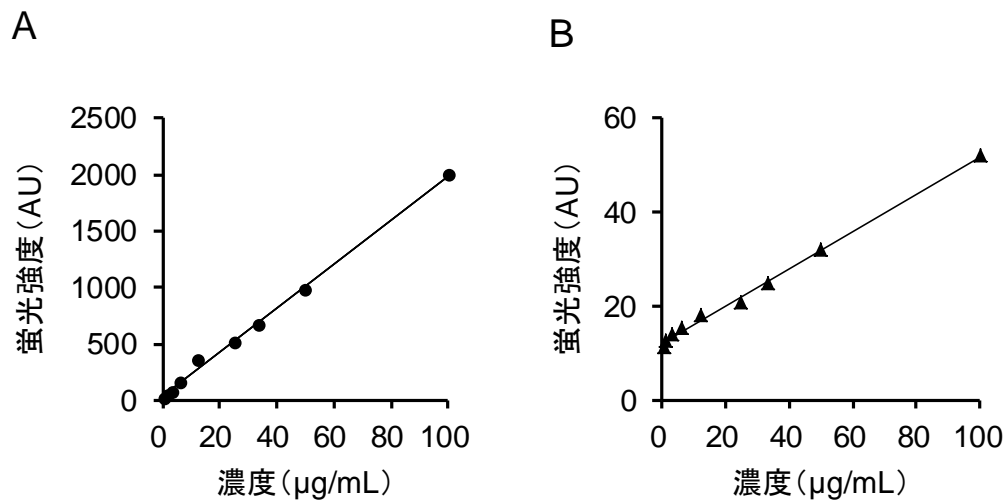


Fig. 4 OG および TMR の蛍光強度と濃度の関係

A:OG

B:TMR

緩衝液はリン酸緩衝液(pH 7.4)を使用した, pH 蛍光測定用蛍光プローブの濃度は 0.78~100 μg/mL, 励起波長は 488 nm(OG)および 543 nm(TMR), 蛍光波長およびスリット幅は 515 / 30 nm(OG), 605 / 75 nm(TMR), C1 Spectral Imaging System で測定, 倍率は×600.

(3) プローブの細胞内局在

OG-dex-TMR を取り込ませた細胞の共焦点蛍光顕微鏡画像を, Fig. 5A に示す. OG の緑色と TMR の赤色が細胞内の同一部位に観察され, 赤色蛍光と緑色蛍光の重なり の程度を示す共局在係数が 0.710 であることから, OG と TMR が同一部位に取り込 まれていることが確認された.

さらに, OG-dex を取り込ませた細胞を, 後期エンドソームおよびリソソームのマー カータンパク質である LAMP2⁶⁰⁾ に対する抗体で処理した結果を Fig. 5B に示した. なお, 抗体はフィコエリスリン (RPE) で標識されており, RPE の赤色の蛍光発色部 位が後期エンドソームおよびリソソームの局在を示すと考えられる. OG および RPE の局在が一致し, 共局在係数が 0.697 であることから, OG が後期エンドソームおよ びリソソームに局在していることが確認され, OG-dex-TMR が後期エンドソームお よびリソソームに局在していることが示唆された.

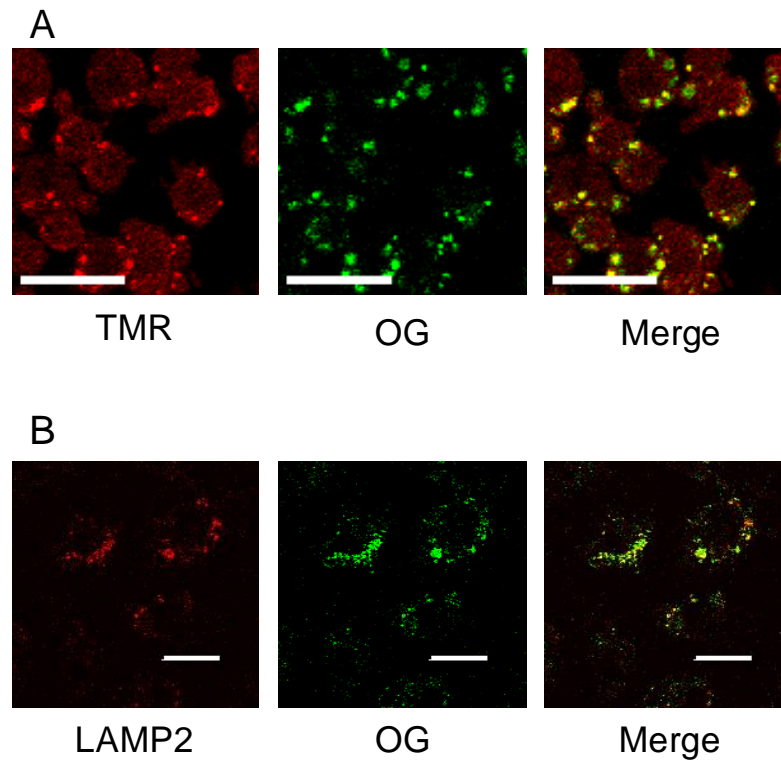


Fig. 5 OG-dex-TMR を取り込んだ RAW264 細胞の蛍光顕微鏡画像(A)および OG-dex の細胞内局在の確認(B)

OG-dex-TMR および OG-dex の濃度は 10 $\mu\text{g/mL}$, LAMP2 抗体の濃度は 20 $\mu\text{g/mL}$, 励起波長は 488 nm(OG)および 543 nm(TMR, RPE), 蛍光波長およびスリット幅は 515 / 30 nm(OG), 605 / 75 nm(TMR, RPE), C1 Spectral Imaging System で測定, スケールバーは 20 μm を示す. 共局在係数は 0.710(A), 0.697(B).

第2節 後期エンドソームおよびリソソーム内 pH に及ぼす CAD の影響

実験結果・考察

(1) 正常細胞の後期エンドソームおよびリソソーム内 pH に及ぼす CPZ の影響

OG-dex-TMR を取り込ませた、RAW264 細胞に CPZ (50 μ M) および BAF を単独または併用処置した直後 5 分間の OG/TMR のコントロールに対する比を Fig. 6 に示した。CPZ 単独処置後 5 分間の OG/TMR はコントロールと同等であり、後期エンドソームおよびリソソーム内の pH がコントロールと同様であることが示唆された。さらに、BAF を単独処置した細胞においても後期エンドソームおよびリソソーム内の pH に変化が認められなかった。BAF は、リソソームにおいてプロトンの取り込みに関与する v-ATPase を阻害する作用を有している。このことから、v-ATPase の阻害のみでは、リソソームの pH が維持されていることが示唆された。一方、CPZ と BAF を同時に処置した場合において、OG/TMR の上昇が認められた。

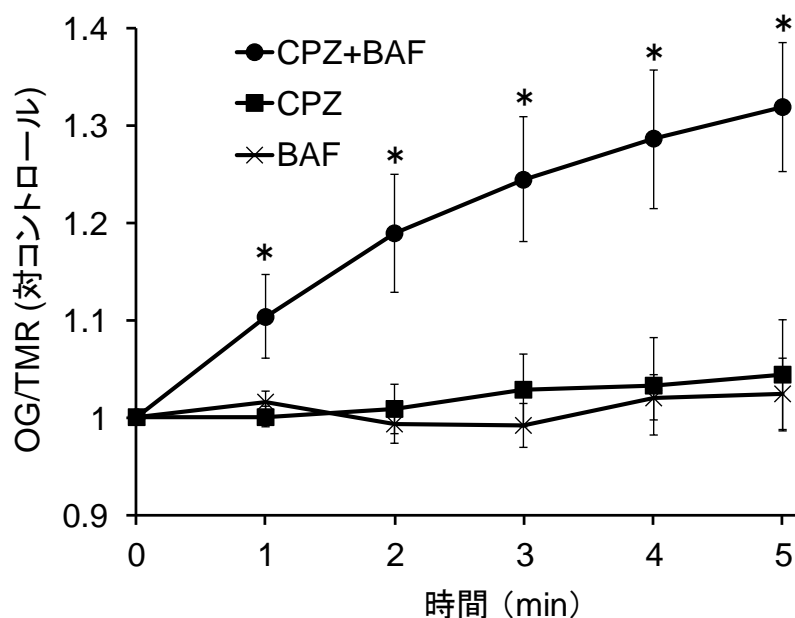


Fig. 6 CPZ または BAF 処置直後の後期エンドソームおよびリソソーム内 pH の変化

平均±標準誤差 ($n = 4$)

* : $p < 0.05$ vs CPZ (Mann-Whitney の U 検定)

OG-dex-TMR および CPZ, BAF の濃度はそれぞれ 0.1 mg/mL, 50 μ M, 100 nM. BAF および CPZ の処置時刻はそれぞれ-5 分, 0 分. 励起波長は 488 nm (OG) および 543 nm (TMR). 蛍光波長およびスリット幅は 515 / 30 nm (OG) および 605 / 75 nm (TMR). C1 Spectral Imaging System で測定.

次に、OG-dex-TMR を取り込ませた、RAW264 細胞の培養液を MON とクエン酸緩衝液を含有した RPMI1640 (pH 4.0~6.0) に交換し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した。MON はナトリウムイオノフォアであるため、MON を添加すると、細胞内外のナトリウム濃度勾配が無くなり、細胞内を細胞外液の pH と等しくすることが可能である⁶¹⁾。この働きを利用して、後期エンドソームおよびリソソーム内の pH を、交換した培養液の pH となるように調整し、得られた OG/TMR の値から検量線を作成した ($r = 0.835 \sim 0.956$)。CPZ または CPZ と BAF を OG-dex-TMR を取り込ませた RAW264 細胞に、併用処置した後 5 分経過後の OG/TMR を測定し、作成した検量線から pH を測定した。Table 1 には、測定した pH を示した。後期エンドソームおよびリソソーム内の pH は、CPZ 単独処置時では 4.95 ± 0.06 と正常値であるのに対し BAF を併用することで 6.23 ± 0.07 と有意に上昇していることが明らかとなった。過去の報告では、pH の上昇を引き起こす理由として後期エンドソームおよびリソソーム内に入った CAD がイオン形となることで遊離のプロトンを消費すること⁴³⁾、または、後期エンドソームおよびリソソームからの NHE によるプロトンリークの関与が示唆されている²²⁾。しかし、今回の結果では CPZ 単独処置では pH の上昇が認められず、同時に v-ATPase を阻害することで pH の上昇が認められたことから、CPZ がプロトンと結合することで後期エンドソームおよびリソソーム内の pH を上昇させ得るものの、その上昇が v-ATPase のプロトン取り込みによって抑えられている可能性が示唆された。

Table 1 CPZ 処置後の後期エンドソームおよびリソーム内の pH

5 分処置	50 μ M CPZ	4.95 ± 0.06
	BAF 併用 ^a	6.23 ± 0.07 ^b
23 時間処置	コントロール	4.87 ± 0.21
	10 μ M CPZ	4.80 ± 0.06
	BAF 併用 ^a	5.77 ± 0.04 ^b

平均 \pm 標準誤差 ($n = 4$)

a: 撮影 5 分前に処置

b: $p < 0.05$ vs コントロール, Mann-Whitney の U 検定

(2) リン脂質を過剰蓄積した細胞の作製と評価

RAW264 細胞に, 10 μ M の CPZ または溶媒コントロールとしてメタノールを 4, 8, 24, 32 および 48 時間処置した時の細胞内のタンパク質, リン脂質および CPZ 含量を測定した. 各時間におけるリン脂質量をタンパク質量で補正し, さらに, コントロールに対する相対量で表した結果を Fig. 7A に示した. この結果から, CPZ 処置時間の増加に伴って, 細胞内のリン脂質量が増加していることが確認された. また, RAW264 細胞に CPZ を 4, 8, 24, 32 および 48 時間処置した時の未変化型 CPZ 含量をタンパク質量で補正した結果を Fig. 7B に示した. その結果, 細胞内の CPZ 含有量は, 時間の経過とともに上昇することが明らかとなった. この結果は, 細胞内に取り込まれた CAD が, pH 分配仮説に従い, pH の低いリソソームのような酸性オルガネラに集積するという過去の報告を支持するものであった^{25,26,28,29)}. さらに, CPZ (10 μ M) を 24 時間処置した RAW264 細胞の電子顕微鏡画像を撮影し, ラメラ体の形成を確認した. Fig. 7C には, 撮影した画像を示した. RAW264 細胞の細胞質に, 複数のラメラ体が形成されている様子が確認された. 最後に, リン脂質の蓄積部位がリソソームであるか否か検討した. リン脂質のマーカーには DiI-C18 を, リソソームのマーカーには LysoSensor DND-189 (LysoSensor) を, それぞれ選択した. DiI-C18 は, 分子内に炭素数 18 個のアシル鎖を持ち, そのアシル鎖がリン脂質膜と相互作用することで細胞膜に挿入される⁶²⁾. また, LysoSensor は, 塩基性物質であり, 細胞内ではリソソームに集積する性質を持つ蛍光色素である. これら 2 種の色素を用いて, CPZ を 23 時間処置した細胞を染色し, 共焦点レーザー蛍光顕微鏡で撮影した画像を Fig. 7D に示した. DiI-C18 と LysoSensor の局在に相同性が認められ, 共局在係数が 0.850 であったことから, 細胞内のリン脂質の多くが, リソソームに蓄積していることが示唆された. 以上の結果から, CPZ (10 μ M) を 24 時間処置することで, リン脂質を過剰に蓄積した細胞が作製できることが示唆された.

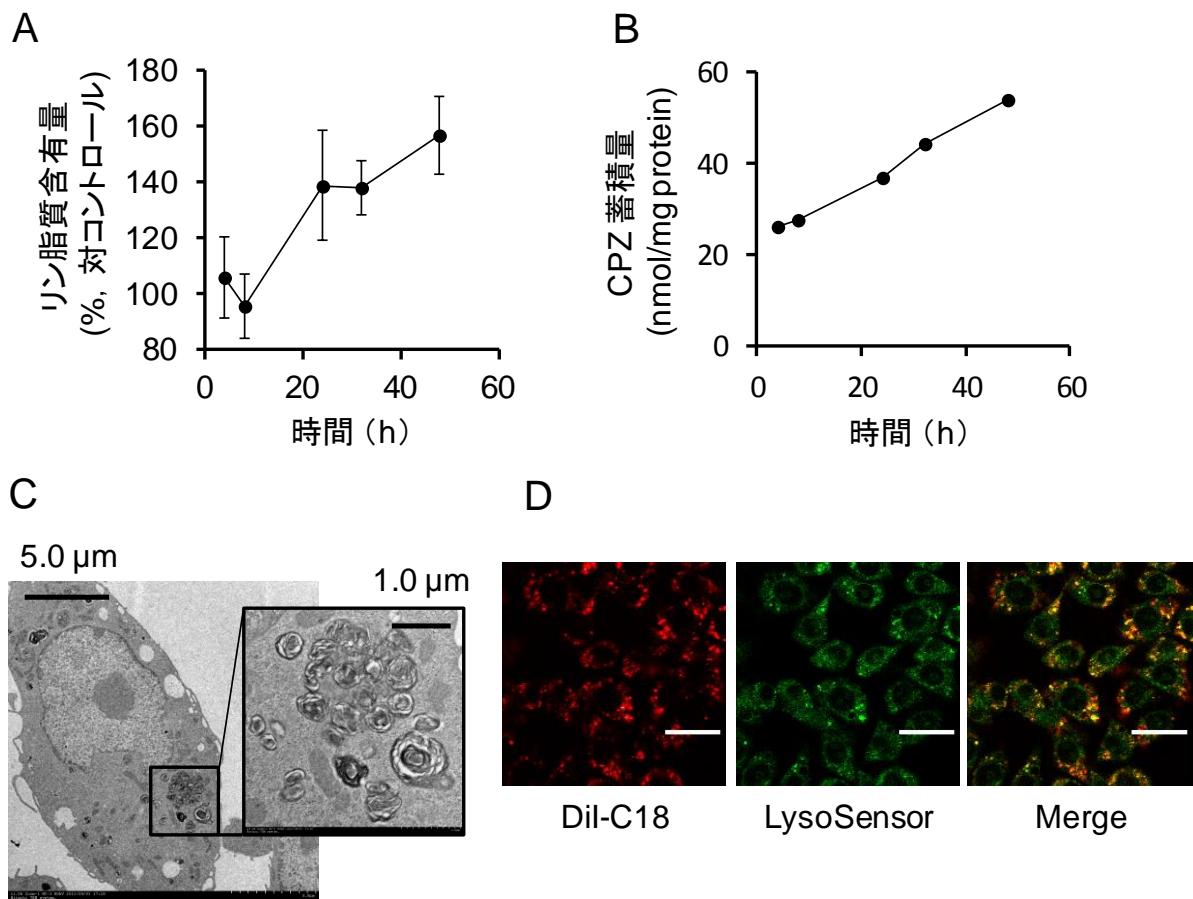


Fig. 7 CPZ 処置によってリン脂質の過剰蓄積が生じていることの確認

A:CPZ (10 μM) 処置後の RAW264 細胞内リン脂質含量

B:CPZ (10 μM) 処置後の RAW264 細胞内未変化体 CPZ 含量

C:CPZ (10 μM) 24 時間処置後の RAW264 細胞の電子顕微鏡画像

D:DiI-C18 および LysoSensor を用いて共染色した, CPZ (10 μM) 処置細胞の蛍光顕微鏡画像. 励起波長は 488 nm (OG) および 543 nm (DiI-C18), 蛍光波長およびスリット幅は 515 / 30 nm (OG), 605 / 75 nm (DiI-C18), C1 Spectral Imaging System で測定, スケールバーは 20 μm を示す, 共局在係数は 0.850.

(3) リン脂質を過剰蓄積した細胞における後期エンドソームおよびリソソーム内 pH の評価

CPZ を 23 時間処置しリン脂質を過剰蓄積させた細胞の後期エンドソームおよびリソソーム内の pH を第 1 章, 第 2 節 (1) と同様に測定した. この時, OG-dex-TMR の処置時間が正常細胞と同様の 2 時間では OG-dex-TMR がリン脂質を過剰蓄積した細胞に取り込まれなかったため, OG-dex-TMR の処置時間を 5 時間に延長した. そのため, この処置時間の延長が今回の測定に影響しないことを初めに検討した. 処置時間を延長した細胞と正常細胞に, 検量線用の培養液 (クエン酸緩衝液, MON 含有 RPMI1640, pH 5.0) を処置し, OG/TMR を比較したところ, 処置時間を延長した細胞の OG/TMR は正常細胞の約 0.98 倍であり, ほとんど差は認められなかった. また, リン脂質を過剰に蓄積した RAW264 細胞に OG-dex を 5 時間処置し, さらに, 抗 LAMP2 抗体で免疫染色した蛍光顕微鏡画像を Fig. 8 に示した. OG の緑色蛍光と RPE の赤色蛍光とが同一部位に認められ, 共局在係数が 0.609 であった. このことから, OG-dex-TMR の 5 時間処置により, リン脂質を過剰蓄積した細胞の後期エンドソームおよびリソソームに OG-dex-TMR が集積することが示唆された. 次に, リン脂質を過剰蓄積した細胞の後期エンドソームおよびリソソーム内の pH を測定した結果を Table 1 に示した. 加えて, リン脂質を過剰蓄積した細胞に BAF を添加し, 5 分後の pH についても同様に Table 1 に示した. リン脂質を過剰蓄積した細胞の後期エンドソームおよびリソソーム内 pH は 4.80 ± 0.06 であることから, DIPL 発症時においても正常な値を維持していることが示唆された. さらに, BAF の処置によって, pH は 5.77 ± 0.04 まで有意に上昇した. このことから, 細胞内に存在する CPZ が, 後期エンドソームおよびリソソーム内に蓄積していることが示唆された. 加えて, CPZ がイオン形となることで消費されるプロトンが, v-ATPase によって補充されることで pH が維持されていることが示唆された.

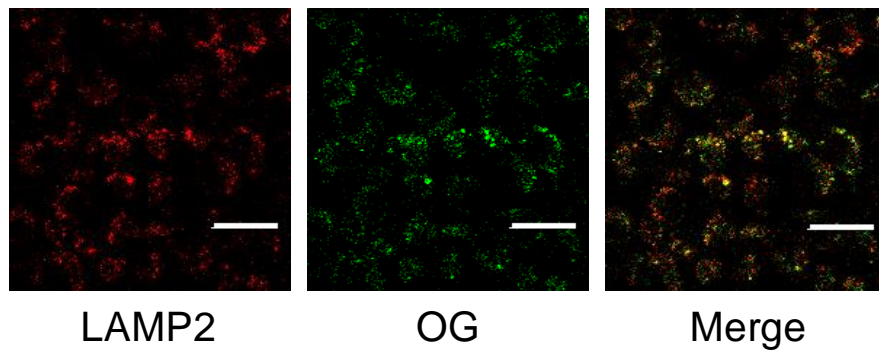


Fig. 8 リン脂質を過剰に蓄積した RAW264 細胞の OG と LAMP2 による共染色画像

CPZ は 10 μ M を 23 時間処置, OG-dex の濃度は 10 μ g/mL, LAMP2 抗体の濃度は 20 μ g/mL, 励起波長は 488 nm (OG) および 543 nm (RPE), 蛍光波長およびスリット幅は 515 / 30 nm (OG), 605 / 75 nm (RPE), C1 Spectral Imaging System で測定, スケールバーは 20 μ m を示す. 共局在係数は 0.609.

第3節 後期エンドソームおよびリソソーム内の酵素活性に及ぼす CAD の影響

実験結果・考察

(1) プローブの設計

後期エンドソームおよびリソソーム内には、LPLA₂ だけではなく α -グルコシダーゼのような糖代謝酵素や、カテプシン類のようなタンパク質分解酵素が含まれることが知られている。前述のように、CAD は LPLA₂ のようなリン脂質分解酵素を拮抗的または非拮抗的に阻害作用することが明らかとなっている^{37,39,40}。そのため、リン脂質分解酵素の活性が CAD 処置によって低下したとしても、pH の上昇に伴って活性が低下したと結論づけることが困難であると考えられる。そこで、今回の評価では、後期エンドソームおよびリソソーム内のタンパク質分解酵素の活性に着目することとした。

タンパク質分解酵素活性の評価には、濃度消光解消法を利用した。測定には、BSA に TMR を化学結合させたプローブ (BSA-TMR) を使用した。一分子の BSA に TMR が過剰に結合すると、TMR 分子が近接し、濃度消光を引き起こす。この BSA-TMR が細胞内で酵素によって分解されると、TMR の濃度消光が解消されるため蛍光強度が上昇する。また BSA は、細胞にエンドサイトーシスにより取り込まれることが知られている¹⁶。そこで本実験では、BSA-TMR と OG-dex を RAW264 細胞に取り込ませ、TMR の蛍光強度と OG の蛍光強度の比 (TMR/OG) を用いて酵素活性を評価することとした。

(2) 酵素活性評価プローブの評価

まず、作製した BSA-TMR に TMR が過剰に化学結合しているか否か検討した。マトリクス支援レーザー脱離イオン化法-飛行時間型質量分析計 (matrix assisted laser desorption ionization-time of flight/mass spectrometry: MALDI-TOF/MS, AXIMA CFR plus, 島津製作所) を用いて、作製した BSA-TMR を質量分析した結果を Fig. 9 に示した。未反応の BSA の質量分析によって得られたピークと比較して、BSA-TMR の分子イオンのピークが m/z 値で約 950 高値であったことから、平均 2.1 分子の TMR (分子量 443.52) が、BSA に結合していることが示唆された。次に、酵素で BSA を消化することで TMR の蛍光強度が上昇することを蛍光分光光度計 (RF-540) によって検討

した．得られた蛍光スペクトルを Fig. 10 に示した．塩酸酸性下 (0.1 M)，BSA-TMR (1 mg/mL) をペプシンで 1 時間処理することで，TMR の蛍光強度の上昇が確認された．このことから，BSA-TMR を用いて，酸性オルガネラ/リソソーム内のタンパク質分解酵素の活性が評価できることが示唆された．さらに，Fig. 11 には BSA-TMR および，OG-dex を取り込ませた細胞の共染色画像を示した．OG の緑色蛍光と TMR の赤色蛍光の局在に相同性が認められ，共局在係数が 0.700 であったことから，BSA-TMR の後期エンドソームおよびリソソームへの局在が示唆された．

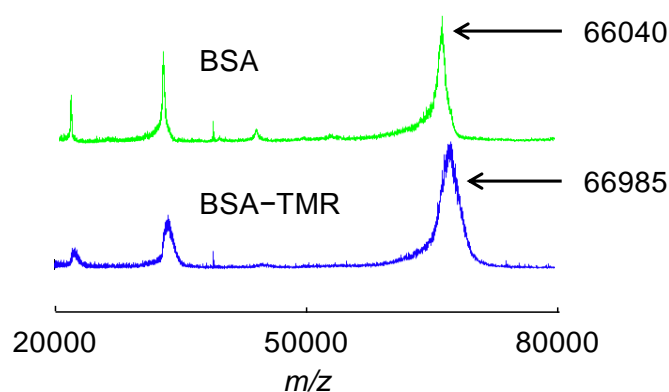


Fig. 9 BSA-TMR の質量分析スペクトル

BSA の分子量は 66 kDa, TMR の分子量は 443.52 Da, マトリクスには α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid を使用, AXIMA CFR plus で測定.

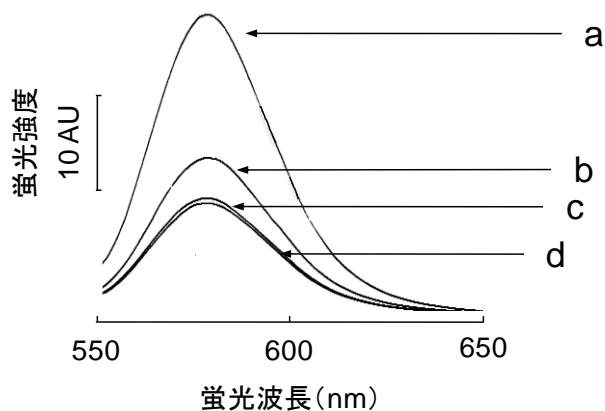


Fig. 10 BSA-TMR の蛍光スペクトル

a: 1 h ペプシン処理

b: 1 h コントロール

c: 0 h ペプシン処理

d: 0 h コントロール

励起波長は 543 nm, 蛍光波長幅は 550~650 nm, 反応溶液は 0.1 M HCl, 反応温度は 37 °C, BSA-TMR の濃度は 1 mg/mL, RF-540 で測定

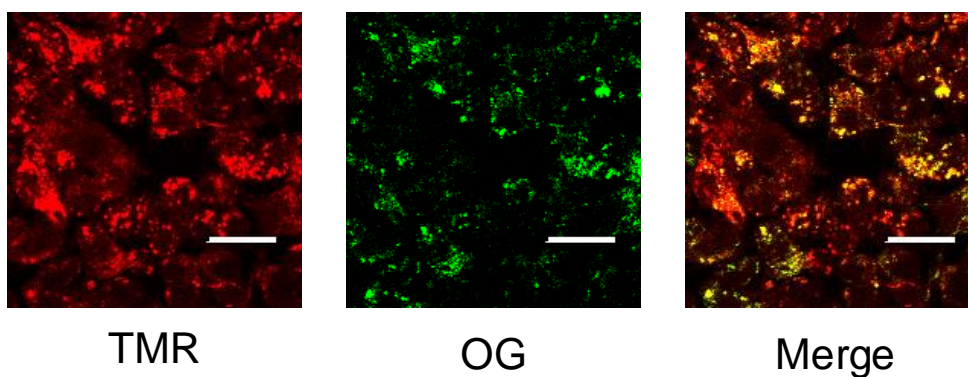


Fig. 11 BSA-TMR と OG-dex を取り込ませた RAW264 細胞の蛍光顕微鏡画像
OG-dex の濃度は 20 $\mu\text{g/mL}$, BSA-TMR の濃度は 80 $\mu\text{g/mL}$, 励起波長は 488 nm (OG) および 543 nm (TMR), 蛍光波長およびスリット幅は 515 / 30 nm (OG), 605 / 75 nm (TMR), C1 Spectral Imaging System で測定, スケールバーは 20 μm を示す. 共局在係数は 0.700.

(3) 後期エンドソームおよびリソソーム内の酵素活性におよぼす影響

CPZ を処置した時のリソソーム内のタンパク質分解酵素の活性を BSA-TMR を取り込ませた RAW264 細胞を用いて評価した結果を Fig. 12 に示した. CPZ およびタンパク質分解酵素阻害剤である PMSF 処置直後の TMR/OG を測定した. その結果, コントロール, CPZ 処置および PMSF 処置細胞ともに, TMR/OG は時間経過に伴い上昇が認められた. このことから, BSA が徐々に分解されていることが示唆された. さらに, PMSF を処置した細胞において TMR/OG の上昇がコントロールと比較して有意に抑制された. この結果から, TMR/OG の上昇がタンパク質分解酵素による BSA の分解を反映していることが示唆された. しかしながら, CPZ 処置細胞における TMR/OG の上昇はコントロールと同程度であった. このことから, CPZ 処置が, 細胞内のタンパク質分解酵素の活性に影響していない可能性が示唆された.

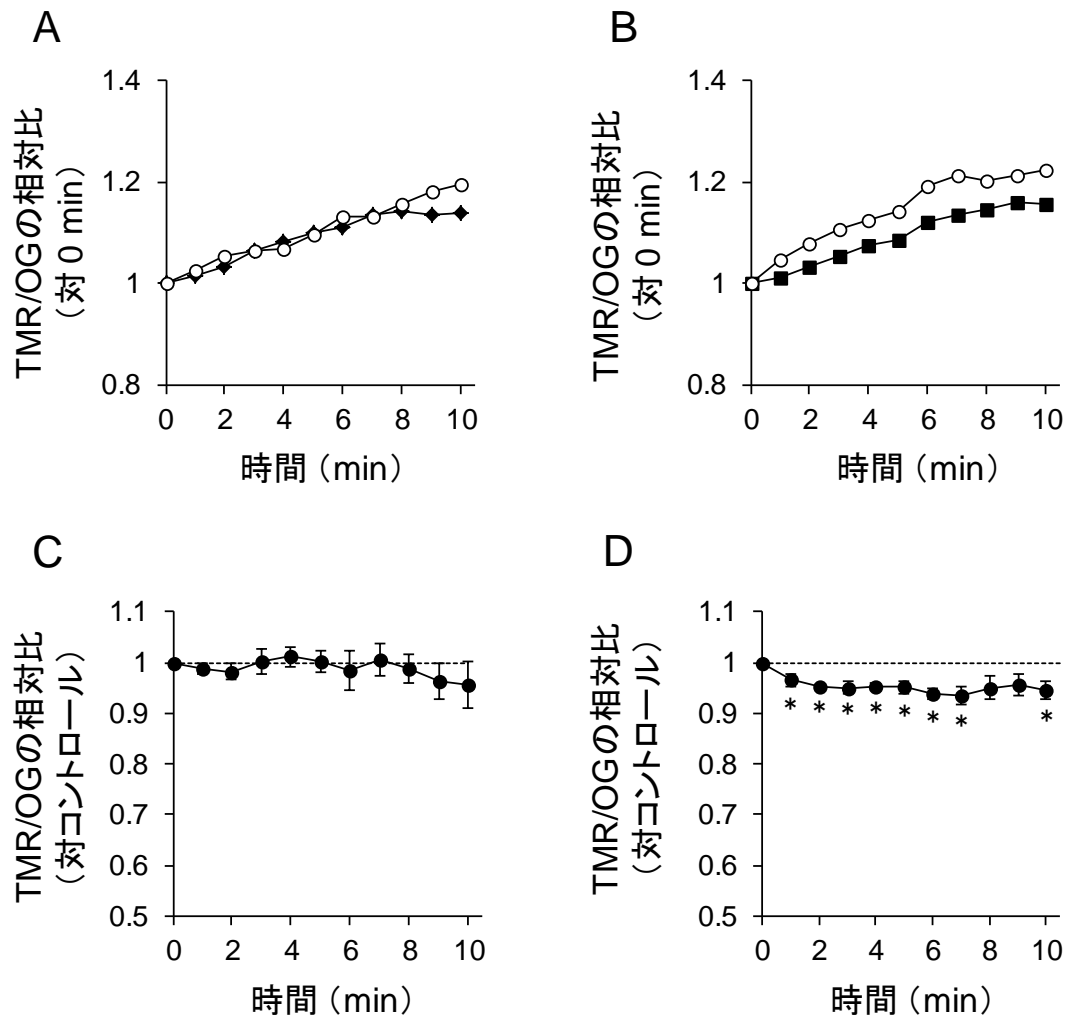


Fig. 12 CPZ 処置後の後期エンドソームおよびリソソーム内のタンパク質分解酵素活性の変化

平均±標準誤差 ($n = 4$)

* : $p < 0.05$ vs 0 分 (t 検定)

A, B: TMR/OG の時間 0 に対する比. ○:コントロール, ◆:CPZ, ■:PMSF.

C, D: TMR/OG のコントロールに対する比.

OG-dex および BSA-TMR の濃度は, それぞれ $20 \mu\text{g/mL}$, $80 \mu\text{g/mL}$. 処置薬物は CPZ (A, C, $50 \mu\text{M}$) または PMSF (B, D, $50 \mu\text{M}$). PMSF および CPZ の処置時刻は, それぞれ -180 分, 0 分. 励起波長は 488 nm (OG), 543 nm (TMR). 蛍光波長およびスリット幅は $515 / 30 \text{ nm}$ (OG) および $605 / 75 \text{ nm}$ (TMR), C1 Spectral Imaging System で測定.

小括

今回作製した pH 測定用蛍光プローブ OG-dex-TMR の蛍光強度は、pH と良好な相関を示した。OG および TMR を dex に結合させることで後期エンドソームおよびリソソーム内に取り込ませることが可能であった。以上の結果から、OG-dex-TMR を用いて細胞の後期エンドソームおよびリソソーム内の pH を測定することが可能であった。

タンパク質分解酵素活性評価用蛍光プローブ BSA-TMR の蛍光強度は、酵素処理によって上昇することが確認された。このことから、BSA-TMR を用いて細胞の後期エンドソームおよびリソソーム内の酵素活性を評価することが可能であった。

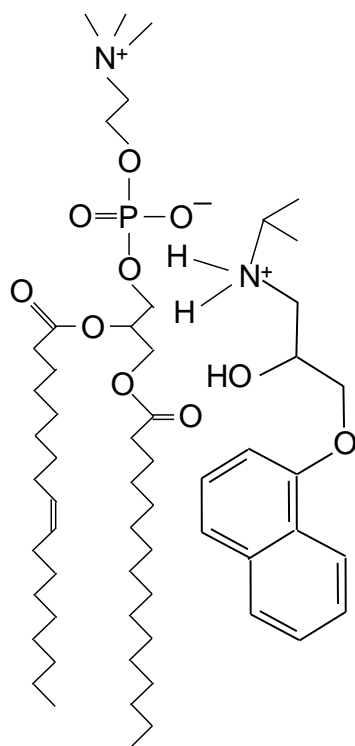
これら蛍光プローブを用いて後期エンドソームおよびリソソーム内の pH およびタンパク質分解酵素の活性を測定した結果、CPZ 処置 5 分後および 23 時間経過時に、後期エンドソームおよびリソソーム内の pH は上昇しておらず、リソソーム内のタンパク質分解酵素の活性も正常であることが示唆された。また、CPZ が後期エンドソームおよびリソソーム内に集積しても、内腔の pH は v-ATPase によって維持されている可能性が示唆された。これは、リン脂質が過剰に蓄積した状態でも同様であった。これらの結果は、CAD による細胞内リン脂質の過剰蓄積に後期エンドソームおよびリソソームの pH が関与していないことを初めて実験的に示したものである。

第2章 CAD と生体膜親和性に及ぼす BMP の影響

CAD は pH 分配仮説に従い、酸性オルガネラの内水相中に高濃度集積する性質を持つことは前章でも述べた。リソソームは、内部が酸性のオルガネラであり、DIPL 発症時にリン脂質が高濃度に蓄積することが明らかになっている²⁾。一方、CAD 自身はリン脂質と強く相互作用する³¹⁻³⁵⁾。Fig. 13 には、生体膜のリン脂質とプロプラノロールとの結合モデルを図示した³⁴⁾。CAD と生体膜との結合は、膜表面では、CAD が持つ正電荷とリン酸基の負電荷との相互作用により、また、膜中では、分子形の CAD とアシル鎖との間の相互作用によって形成されと考えられている。一般的な生体膜は、リン脂質の二分子膜からなり、構成するリン脂質の 40~60% は PC、次いで、PE が 20~40% 含まれる。また、これらに加えて、スフィンゴミエリンや酸性リン脂質である PI, PS, および PG 等が含まれていることもわかっている⁶³⁾。これらの酸性リン脂質は、リン脂質と CAD の結合性を増強させる性質を持つことが明らかになっている^{31,32)}。一方、後期エンドソームやリソソームの生体膜中には、リン脂質の一種で PG の構造異性体である BMP が、約 15% 含まれていることが知られている⁹⁾。BMP は、一般的な生体膜中には、ほとんど含まれておらず、後期エンドソームおよびリソソームの生体膜にのみ多く含有されている。また、BMP を含有する生体膜が、多重膜を形成しやすくなることや^{64,65)}、アミオダロンを処置することで、肺動脈内皮細胞中の BMP 量が増加することが報告されている⁵⁶⁾。しかし、これまで BMP と CAD との間の相互作用について検討した報告は存在しなかった。

そこで、本章では、CAD と生体膜との親和性に及ぼす BMP の影響を調べることを目的とする。モデル CAD としてはプロプラノロールを選択し、BMP の標品には、ジオレオイル BMP を用いて、BMP 含有 egg PC リポソームとプロプラノロールとの相互作用を HPCE/FA により評価した。なお、プロプラノロールはリン脂質との結合実験に数多く利用されてきた CAD であるため、既報のデータとの比較が行いやすく、かつ、疎水性が強すぎない CAD であることから、水系の液相分離法であるキャピラリー電気泳動法に適用しやすい利点をもつ。また、BMP の標品は安価ではないため、結合分析法としては微量試料による測定が可能な HPCE/FA³¹⁾ が適している。

A



B

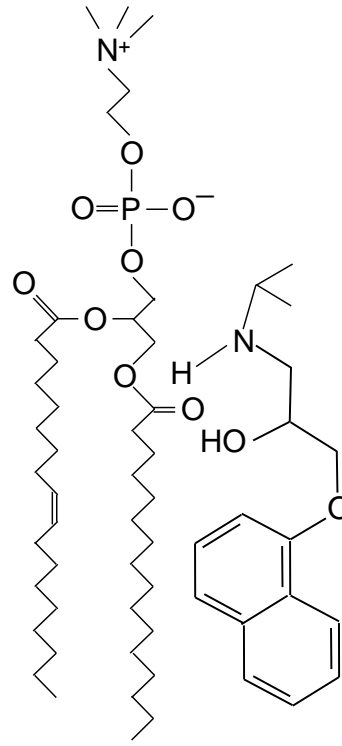


Fig. 13 PCとPROの結合モデル

A: 低 pH 環境下

B: 高 pH 環境下

実験方法

(1) 試薬

Lecithin from egg (egg PC), propranolol (PRO) hydrochloride (> 99%) および 2,4,6-trinitrobenzene- sulfonic acid sodium salt dehydrate (TNBS, > 98%) は、和光純薬工業より購入した。1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (DPPG, > 85%) および 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (DPPS, > 85%) は、日油（東京、日本）より購入した。ジオレオイル BMP: *sn*-1-(3-oleoyl-2-hydroxy)-glycerol-1-phospho-*sn*-1'-(3'-oleoyl-2'-hydroxyl)-glycerol (> 99%) および 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycerol (DAG, > 99%) は、Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) より購入した。DiI-C18 は Invitrogen より購入した。なお、本実験で使用したリン脂質の構造は、Fig. 14 に示した。

(2) リポソームの調製

各リン脂質をクロロホルム：メタノール（2：1）溶液に溶解した。調製するリポソームのリン脂質含量比になるように、各リン脂質溶液をナスフラスコに取り、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を除去し、ナスフラスコ内面にリン脂質の薄膜を作成した。薄膜を作成したナスフラスコに、リポソーム内相の pH になるように調製した緩衝液をとり、激しく攪拌することで、大きな多重膜リポソームを作成した。緩衝液には、50 mM リン酸緩衝液（pH 7.4, イオン強度 0.13）または 55 mM クエン酸緩衝液（pH 5.0, イオン強度 0.13）を用いた。

次に、大きな多重膜リポソームを、凍結、融解を 5 回繰り返した後、孔径 100 nm のポリカーボネートメンブレンに 21 回透過させ、大きな 1 枚膜リポソームを調製した。リポソーム外水相の pH が内水相と異なるリポソームを調製する場合は、得られた大きな 1 枚膜リポソームをセルロースアセテートメンブレン（透過分子量 10,000 以下）に封入し、外水相の pH に調製した緩衝液中で透析操作を行った。リポソーム内の PC 濃度は、リン脂質 C-テストワコー（和光純薬工業）を用いたコリンオキシダーゼ-DAOS 法により定量した。尚、本章では、内水相と外水相の pH の組合せを、「内水相の pH/外水相の pH」として斜線で区切って表す。

さらに、リポソームの粒子径を、FPAR-1000（大塚電子、大阪、日本）を用いた動的光散乱法によって測定した。

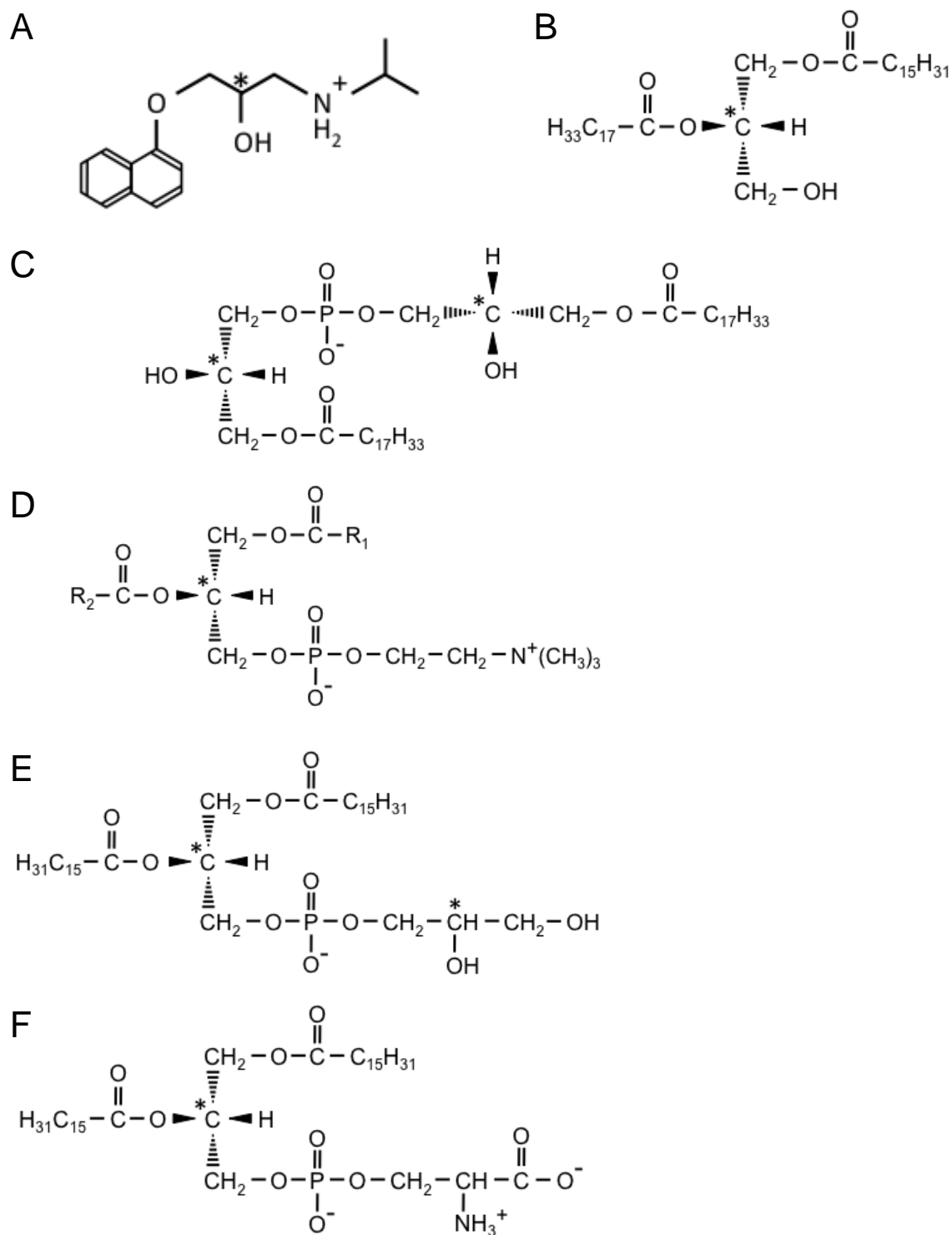


Fig. 14 第2章に使用した脂質および薬物の構造式

A:PRO, B:DAG, C:BMP, D:egg PC, E:DPPG, F:DPPS.

(3) キャピラリー電気泳動/先端分析法 (high performance frontal analysis/capillary electrophoresis, HPFA/CE)

キャピラリー電気泳動装置には、P/ACE5510 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) を使用した。リン脂質モノマー濃度が 500 μM となるように調製したリポソーム溶液に、PRO (20~60 μM) を溶解し HPFA/CE にて分析した。分析には、内面未処理のフューズドシリカキャピラリーを用いた。キャピラリーの内孔径は、100 μm 、外径 375 μm であり、全長 57 または 37 cm、有効長はそれぞれ 50 および 30 cm、キャピラリー温度は 25 $^{\circ}\text{C}$ で分析を行った。短いキャピラリーを用いた場合は、クエン酸緩衝液 (pH 5.0) を泳動緩衝液に用い、印加電圧+4 kV とした。一方、長いキャピラリーを用いた場合は、リン酸緩衝液 (pH 7.4) を泳動緩衝液に用い、印加電圧+7 kV とした。214 nm の吸光度を測定することで得られるエレクトロフェログラムから、PRO の濃度を測定した。

(4) リポソームの膜構造の評価

膜構造の評価は、蛍光消光法を用いて次のように行った。リポソーム調製前にリン脂質を膜染色剤である DiI-C18 で標識し (リン脂質 : DiI-C18 = 100 : 1)、作製したリポソーム (pre-stain) と、リポソーム調製後に DiI-C18 で標識したリポソーム (post-stain) に、蛍光消光剤として TNBS を処理し、残存する蛍光強度の割合を求めた。以上の方法で作製した 2 種のリポソームに、100 mM の TNBS 溶液を添加し、添加前後における DiI-C18 の蛍光強度 (励起波長, 549 nm, 蛍光波長, 580 nm) を蛍光分光光度計 (RF-540, 島津製作所) で測定した。

第1節 CAD とリポソームとの親和性に及ぼす BMP の影響

実験結果・考察

(1) HPFA/CE による分析条件の検討

HPFA/CE とは、キャピラリー内に多量の試料を注入し、これを分離することで得られる台形状ピーク先端のプラトー部分の高さから、試料中の遊離型分子の濃度を測定する方法である。リポソームと薬物の混合試料をキャピラリーに注入し、キャピラリー両端に電圧を印加すると、リポソームと薬物の泳動速度の違いにより、リポソームのゾーンから遊離薬物が引き抜かれる。この時、薬物とリポソームの結合平衡の速さが、分離の速さに比べて十分に大きければ、結合平衡状態が保たれたまま、薬物が遊離型となってリポソームのゾーンから引き出される。したがって、薬物の台形状ピーク先端のプラトー高さから、元の試料の遊離型薬物濃度を求めることができる。

HPFA/CE 法において、シリカキャピラリーの内壁に薬物が物理的に吸着すると、薬物ゾーンの濃縮やテーリングが生じ、プラトー高さが遊離型薬物濃度を反映しなくなる恐れがある。そこで、PRO のキャピラリー内面への吸着が分析に影響するかどうか検討した。キャピラリー内面を線状ポリアクリルアミドでコーティングしたキャピラリーと、内面未処理のフューズドシリカキャピラリーを用いて PRO の検量線を作成した。その結果、コーティングキャピラリーを用いて作成した検量線 ($y = 0.000232x - 0.000131$, $r = 0.995$, $5 \sim 30 \mu\text{M}$) と表面未処理のキャピラリーを用いて作成した検量線 ($y = 0.000246x - 0.000169$, $r = 0.999$, $5 \sim 30 \mu\text{M}$) の傾きと切片のいずれにおいても有意な差は認められなかった ($p > 0.05$)。このことから、表面未処理のキャピラリーを用いても PRO の吸着が分析に影響しないことが確認された。

次に、リポソームと PRO の結合平衡が電氣的注入時に、維持されているかどうかを検討した。Fig. 15 には分析時に得られたエレクトロフェログラムを示す。20 μM PRO 単独試料を分析した時と比較して、リポソーム混合試料の分析によって得られたエレクトロフェログラムでは、台形ピーク先端のプラトー高さが低下した。これは、PRO がリポソームと結合することで遊離型 PRO の濃度が低下していることを示している。次に、結合平衡状態が保たれているかどうかを確かめるために、試料注入時の印加電圧を +7 kV から +4 kV に変化させ分析した結果、ピークの高さに変化が認められなかった。このことから、結合平衡が維持された状態で分析できていることが示唆された。

加えて、今回作製したリポソームの粒子径を動的光散乱法により測定した。その結果を Table 2 に示す。平均粒子径に大きな差はなく 157.3～168.6 nm であったことから、今回の結合実験の結果に与える、リン脂質二分子膜の曲率の影響は、限定的と考えられる。

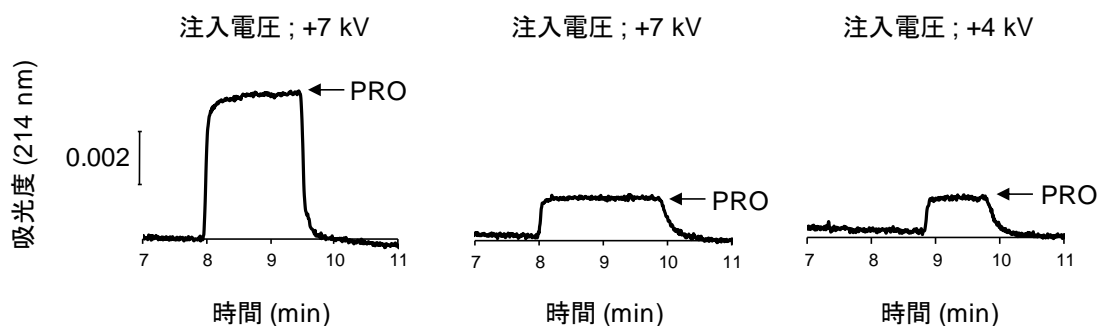


Fig. 15 キャピラリー電気泳動/先端分析法で得られるエレクトロフェログラム

試料: 20 μM PRO (左), 20 μM PRO と 20% BMP 含有 egg PC リポソーム (500 μM , 中央, 右) の混合物。泳動緩衝液: リン酸ナトリウム緩衝液 (50 mM, pH 7.4)。注入電圧: +7 kV または +4 kV, 注入時間: 100 秒, キャピラリー温度: 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

Table 2 調製したリポソームの粒子径

リン脂質	pH 条件	粒子径
egg PC	7.4 / 7.4	158.6 nm
20% BMP	7.4 / 7.4	157.3 nm
	5.0 / 7.4	160.9 nm
	5.0 / 5.0	158.1 nm
20% PG	7.4 / 7.4	168.6 nm

egg PC: egg PC リポソーム, 20% BMP: 20% BMP 含有 egg PC リポソーム, 20% PG: 20% PG 含有 egg PC リポソーム, リン脂質濃度: 500 μM , 使用機器: FPAR-1000.

(2) PRO とリン脂質リポソームの結合におよぼす BMP の影響

ジオレオイル BMP を 10% または 20% 含有した egg PC リポソームを作成し、中性条件での PRO とリポソームの結合性について検討した。Egg PC リポソーム、10% BMP 含有 egg PC リポソームまたは 20% BMP 含有 egg PC リポソームと PRO との混合物を HPCE/FA により分析し、得られた Scatchard plot を Fig. 16A に示した。例えば、薬物とレセプターの結合などの部位特異的な結合の場合では、結合リガンド濃度の増加に伴い結合の飽和が生じるため、一般に、Scatchard plot は右下がりの直線を与え、この直線の傾きから、結合定数 (K) が得られる。一方、今回の結果では、リン脂質一分子に結合している PRO 分子の数 (r) に関わらず、遊離 PRO 濃度 (C_u) と r の比 (r/C_u) が横軸に平行であった。このことは、PRO とリポソームの結合に飽和が生じておらず、PRO とリン脂質の結合が、特異的な結合部位を持たない分配的な結合であることを示している^{31,35)}。そのため、結合性の評価には r/C_u の平均値から算出した、total binding affinity (nK , リン脂質一分子あたりの PRO の最大結合数と結合平衡定数の積) を用いた。次に、 r/C_u から算出した各リポソームと PRO との total binding affinity (nK) を Fig. 16B に示した。リポソームの BMP 含有量を 10%, 20% と増加させることで、 nK 値はそれぞれ、2.1 倍、4.0 倍と有意に高値を示した ($p < 0.01$)。このことから、BMP がリポソームと PRO との結合を強めることが明らかとなった。

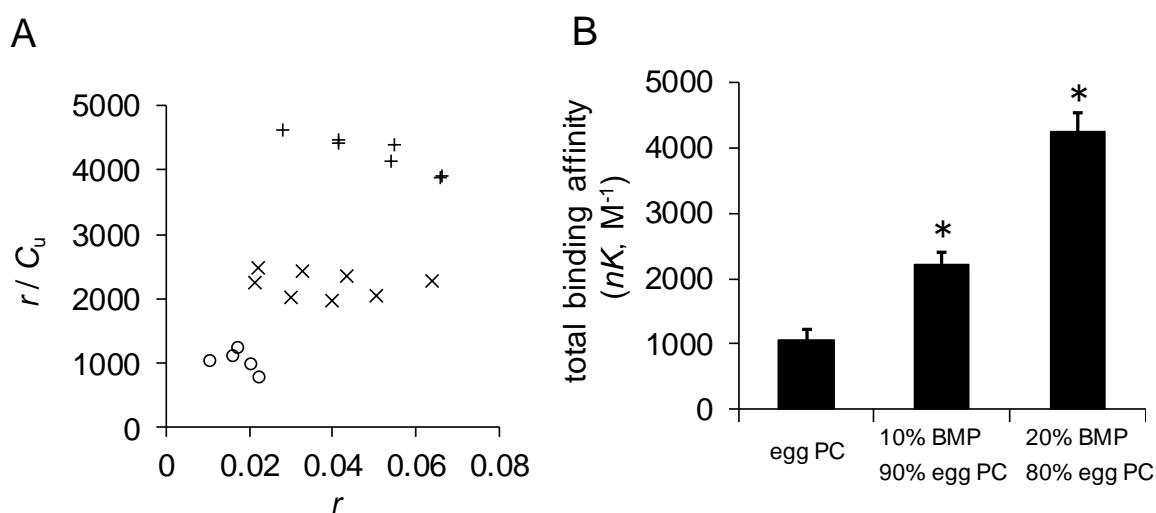


Fig. 16 BMP 含有リポソームと PRO の結合を示す Scatchard plot と total binding affinity

A: PRO-リポソーム結合の Scatchard plot.

r :リン脂質1分子あたりに結合する PRO 分子数. C_u :遊離 PRO 濃度. ○:egg PC リポソーム. ×: 10% BMP 含有 egg PC リポソーム. +:20% BMP 含有 egg PC リポソーム.

B:PRO のリポソームに対する total binding affinity.

平均±標準偏差(egg PC: $n = 5$, 10% BMP 90% egg PC: $n = 8$, 20% BMP 80% egg PC: $n = 7$).

* : $p < 0.01$ (vs egg PC, Mann-Whitney の U 検定).

egg PC:egg PC リポソーム. 10% BMP 90% egg PC:10% BMP 含有 egg PC リポソーム. 20% BMP 80% egg PC:20% BMP 含有 egg PC リポソーム.

A, B ともにリン脂質濃度 500 μM . 注入電圧+7 kV. 他の HPCE/FA 条件は Fig. 15 に同じ.

(3) PRO と BMP 含有 PC リポソームの結合におよぼす静電相互作用の影響

過去の報告から、PS、PI および PG といった酸性リン脂質を含有することで、リン脂質と CAD の結合性が増強する要因として静電相互作用の関与が明らかにされている³¹⁻³⁴⁾。このことから、酸性リン脂質である BMP を含有するリポソームと PRO との結合にも静電相互作用が関係している可能性が示唆される。そこで、分析に用いる緩衝液のイオン強度を変化させることで BMP 含有リポソームと PRO との結合における静電相互作用の効果を検討した。50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4, イオン強度 0.13) に変えて、27 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4, イオン強度 0.07) を用いて、20% BMP 含有 egg PC リポソームを調製し、同じ緩衝液を泳動緩衝液に用いて HPFA/CE により PRO との結合性を分析した。結果を Fig. 17 に示す。イオン強度の小さい緩衝液を用いて得られた、 nK 値は、高イオン強度の時に比べて 1.4 倍と有意に上昇した。このことから、BMP 含有リポソームと PRO の結合に、静電相互作用が寄与していることが示唆された。さらに、静電相互作用における、BMP のリン酸基の影響を検討するため、BMP の代わりに、リン酸基を持たない、DAG を含有したリポソームを用いて PRO との結合性を検討した。結果を Fig. 18 に示す。DAG を 20% 含有する egg PC リポソームの PRO に対する nK 値は BMP 含有 egg PC リポソームに比べ 0.15 倍と有意に低値を示し、この値は、egg PC リポソームよりも低値であった。以上の結果から、BMP と PRO の結合に静電相互作用が寄与していること、さらにその静電相互作用に BMP のリン酸基が関係していることが示唆された。

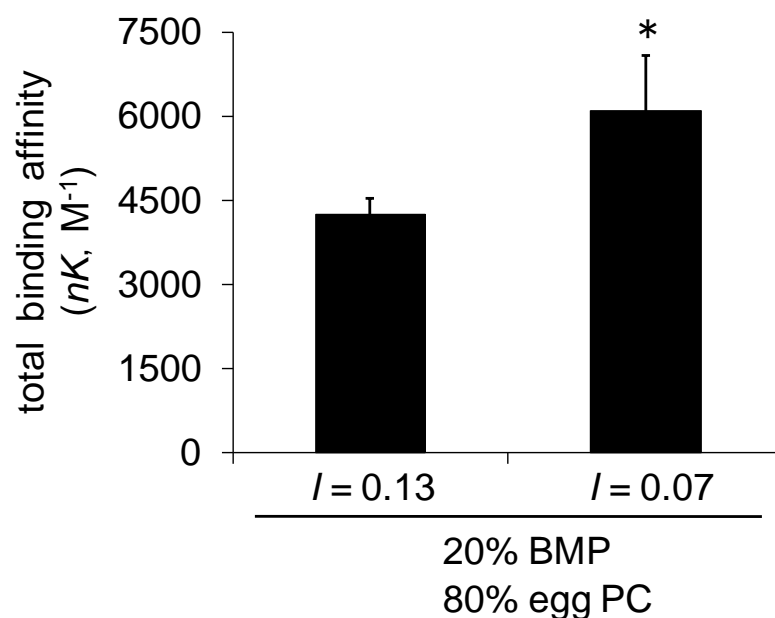


Fig. 17 BMP 含有リポソームと PRO の結合性に及ぼすイオン強度の影響
平均±標準偏差 ($I = 0.13: n = 7$, $I = 0.07: n = 4$).

* : $p < 0.01$ (vs $I = 0.13$, Mann-Whitney の U 検定).

20% BMP 80% egg PC: 20% BMP 含有 egg PC リポソーム. リン脂質濃度: 500 μM . 泳動緩衝液: リン酸ナトリウム緩衝液 (27 mM または 50 mM, pH 7.4). 注入電圧: +7 kV. 他の HPCE/FA 条件は Fig. 15 に同じ.

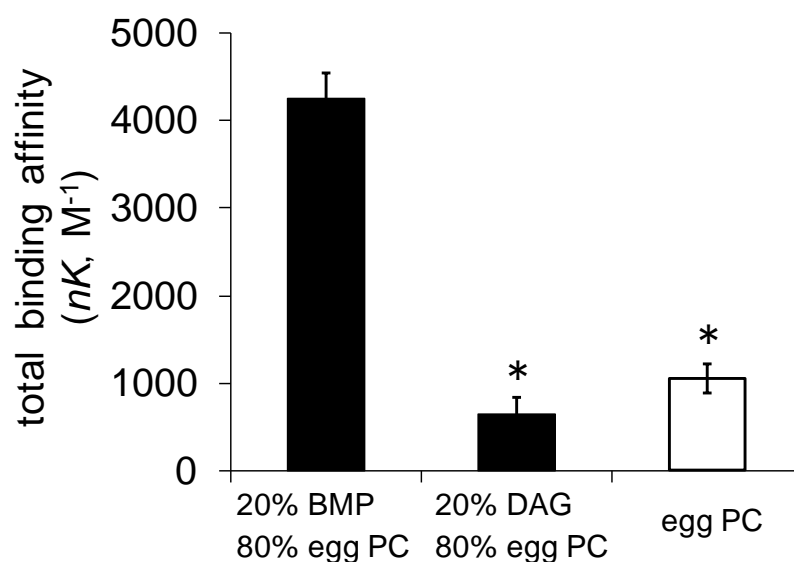


Fig. 18 BMP 含有リポソームと PRO の結合性に及ぼす極性頭部の影響
平均±標準偏差 (20% BMP 80% egg PC: $n = 7$, 20% DAG 80% egg PC: $n = 4$, egg PC: $n = 5$).

* : $p < 0.01$ (vs 20% BMP 80% egg PC, Mann-Whitney の U 検定).

20% BMP 80% egg PC: 20% BMP 含有 egg PC リポソーム. 20% DAG 80% egg PC: 20% DAG 含有 egg PC リポソーム. egg PC: egg PC リポソーム. リン脂質濃度: 500 μM . 注入電圧: +7 kV. 他の HPCE/FA 条件は Fig. 15 に同じ.

(4) BMP と他の酸性リン脂質との間における結合性増強効果の比較

これまでの結果から、酸性リン脂質である BMP が、静電相互作用の寄与により、PRO と egg PC リポソームとの結合性を増強させることが明らかになった。そこで次に、この BMP の結合性増強効果が、他の酸性リン脂質と同等であるか否かについて検討した。検討には、酸性リン脂質である、DPPG および DPPS を用いた。PG は、BMP と構造異性体の関係にあり、分子内に持つ電荷の数が等価の酸性リン脂質である。一方、PS は、BMP と同様、一価の酸性リン脂質ではあるが、極性頭部中に 2 個の負電荷と 1 つの正電荷を有している。DPPS および DPPG を 20% 含有した egg PC リポソームを作製し、PRO との結合性について HPCE/FA を用いて同様に分析した。算出した nK 値を 20% BMP 含有 egg PC リポソームと比較した結果を Fig. 19 に示す。BMP 含有 PC リポソームの nK 値と DPPG 含有 egg PC リポソームとの nK 値の間に有意な差は認められなかった。このことから、BMP と PG の間の構造の差異が PRO との結合に影響しないことが示唆された。一方、DPPS 含有 egg PC リポソームの nK 値は PC 程ではないものの BMP と比較して 0.80 倍と有意に低値を示した ($p < 0.01$)。この理由について詳細は不明である。しかし、リン脂質の分子構造を考えたとき、水相中から二分子膜に PRO が接近してくる過程において、PS が極性頭部に正電荷を有するために、PRO の正電荷と反発し、結合が妨げられていることが、1 つの可能性として考えられる。

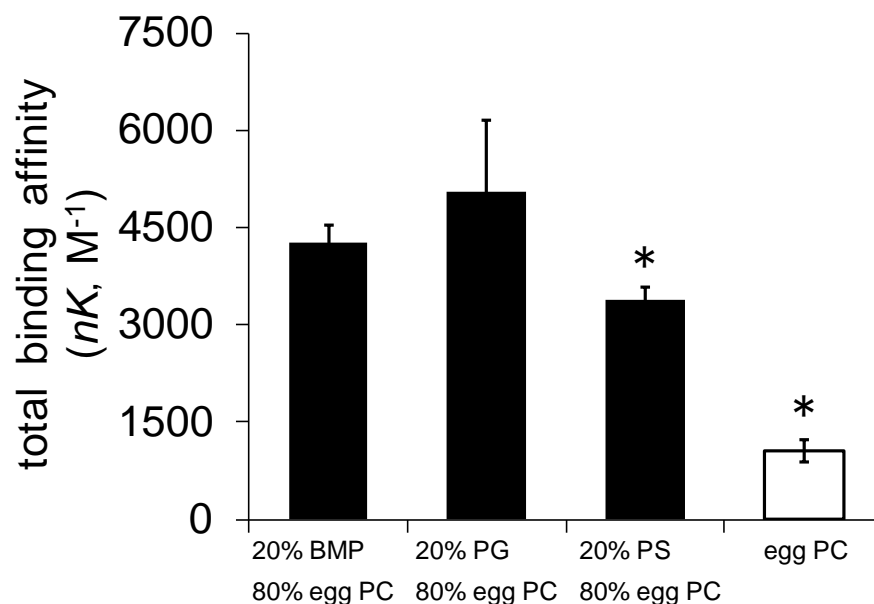


Fig. 19 リポソームと PRO の結合性に及ぼす酸性リン脂質の影響

平均±標準偏差 (20% BMP 80% egg PC: $n = 7$, 20% PG 80% egg PC: $n = 4$, 20% PS 80% egg PC: $n = 4$, egg PC: $n = 5$).

*: $p < 0.01$ (vs 20% BMP 80% egg PC, Mann-Whitney の U 検定).

20% BMP 80% egg PC: 20% BMP 含有 egg PC リポソーム. 20% PG 80% egg PC: 20% PG 含有 egg PC リポソーム. 20% PS 80% egg PC: 20% PS 含有 egg PC リポソーム. egg PC: egg PC リポソーム. リン脂質濃度: 500 μM . 注入電圧: +7 kV. 他の HPCE/FA 条件は Fig. 15 に同じ.

第2節 CAD とリポソームとの親和性に及ぼす pH の影響

(1) BMP 含有 egg PC リポソームと PRO との結合性に及ぼす pH の影響

DIPL 発症時には、CAD は pH 分配仮説にしたがってリソソーム等の酸性オルガネラに取り込まれて、酸性環境下で細胞膜と結合していることが考えられる。そこで内水相の pH をリソソーム内腔の pH と同条件に変化させたりポソームを作製し、PRO との結合性を検討した。リソソーム内腔の pH はおよそ 5 であることがこれまでに報告されている⁵²⁾。そこで、20% BMP 含有 egg PC リポソームと egg PC リポソームについて、内水相/外水相の pH がそれぞれ 5.0/5.0, 5.0/7.4 および 7.4/7.4 に調整したりポソームを作製した。

BMP を含有したリポソームは、低 pH 条件下において多重膜リポソームを形成しやすいことがこれまでに報告されている^{64,65)}。そこで、作製した 6 種のリポソームの膜構造に差が生じているか否かを蛍光消光法により検討した。蛍光消光法の概略図を Fig. 20 に示す。今回の方法では、仮に一枚膜構造のリポソームが作製できている場合、pre-stain にはリポソーム全体に DiI-C18 が存在するため、外側の DiI-C18 のみ TNBS に処理され、蛍光強度が約 50% 減弱する。一方 post-stain は、外側のみ DiI-C18 で染色されていることから、理論上 100% 蛍光が消光すると考えられる。また、今回作製した各リポソームの結果を Fig. 21 に示した。その結果、内外の pH が同じ PC リポソーム 2 種において、pre-stain の蛍光残存率が 50% 程度であり、post-stain の蛍光強度は、90% 程度消失した。このことから、これらの PC リポソームが、一枚膜であることが示唆された。一方、その他のリポソームは、一枚膜ではない可能性が示唆された。このことは、粒子径の同じリポソームに、粒子径の小さなリポソームが内封されている可能性を示唆している。しかしながら、CAD が細胞に処置された時、速やかに膜を透過してリソソーム内に集積することが明らかである²⁵⁾。そのため、多重膜リポソームであることは、結合性に大きく影響しないと考えられる。

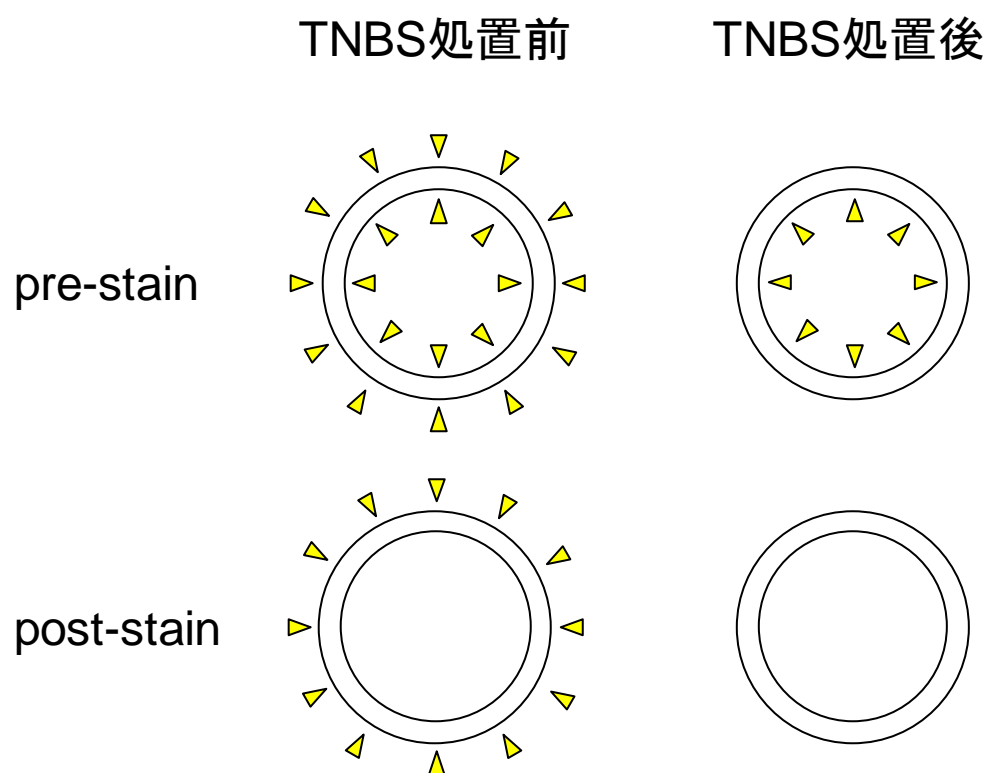


Fig. 20 一枚膜リポソームにおける蛍光消光法の模式図

pre-stain(上)はリポソームの内膜と外膜両方に DiI-C18 の蛍光(▲)が認められ、TNBS 処理によって、外膜のみ蛍光が消光する。post-stain(下)は外膜のみ DiI-C18 の蛍光が認められ、TNBS 処理によって全ての蛍光が消光する。

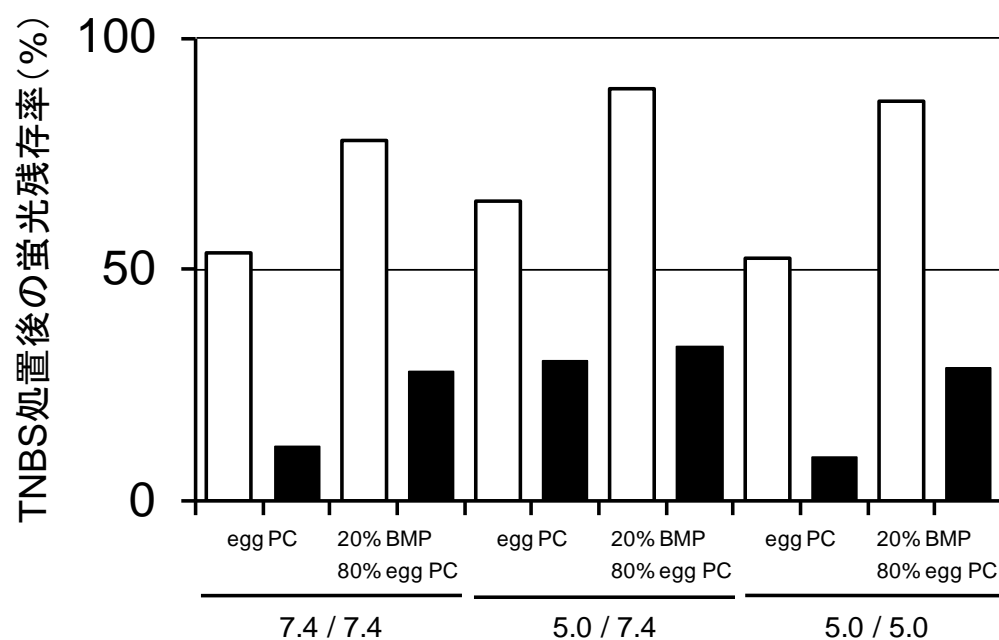


Fig. 21 蛍光消光法を用いたリポソームのラメラリティーの検討

egg PC:egg PC リポソーム, 20% BMP 80% egg PC:20% BMP 含有 egg PC リポソーム, リン脂質濃度:500 μ M, □:pre-stain, ■:post-stain.

次に、作製した pH の異なるリポソームを用いて PRO との結合性を評価した。その結果を Fig. 22 に示す。内外の pH が 7.4/7.4 の BMP 含有 PC リポソームと比較して 5.0/5.0 のリポソームの nK 値は 0.40 倍と有意に低値を示した。また、5.0/7.4 のリポソームにおける nK 値は 7.4/7.4 のリポソームに比べ有意ではないものの、0.76 倍低値であった。この時、リン脂質内のリン酸基が持つ負電荷は pK_a が 1 以下であり⁶⁷⁾、今回の分析条件 (pH 5.0 および pH 7.4) において pH 単位で 4 から 6 の差が認められる。一方、PRO の pK_a は 9.45 であり、pH 単位での差は 2 から 4 である。そのため、本条件下ではリン酸基はいずれも負電荷を持っており、PRO のイオン形と分子形の比率が、変化していると考えられる。このことから低 pH 条件においてリポソームと PRO との親和性が低下した理由は、PRO のイオン形分率の上昇と分子形分率の低下に起因していると考えられる。さらに、リポソームを構成するリン脂質の、アシル鎖部分と PRO の分子形との間に、疎水性相互作用が形成されることがわかっている³¹⁻³⁴⁾。以上のことから、低 pH 条件では、PRO の分子形分率が低下するために、リポソームとの間の疎水性相互作用が減弱し、結合性の有意な低下が生じたと考えられる。

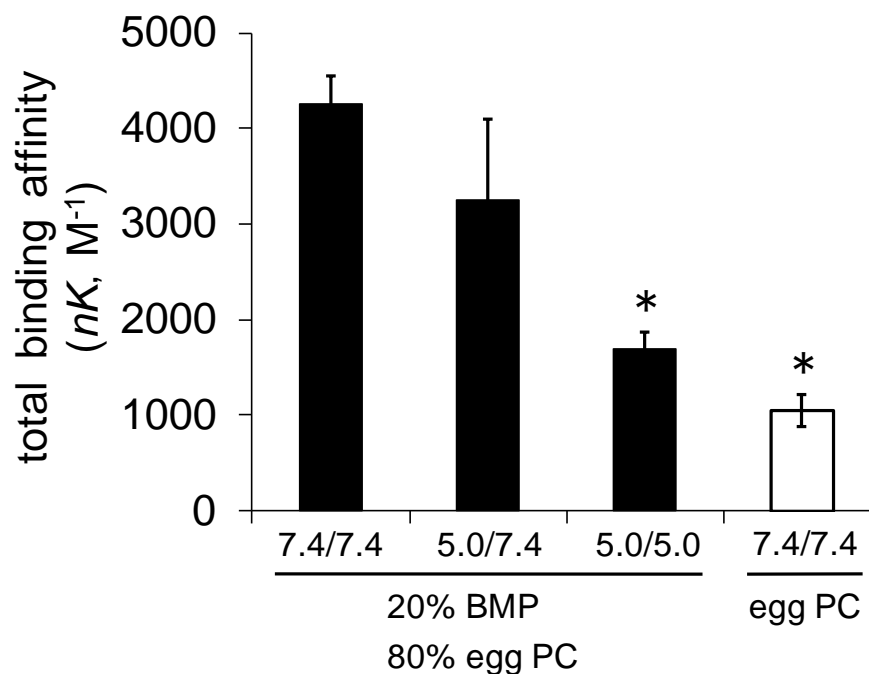


Fig. 22 BMP 含有リポソームと PRO の結合性に及ぼす pH の影響

平均±標準偏差 (20% BMP 80% egg PC, 7.4/7.4: $n = 7$, 5.0/7.4: $n = 4$, 5.0/5.0: $n = 4$, egg PC: $n = 5$).

*: $p < 0.01$ (vs 20% BMP 80% egg PC, 7.4/7.4, Mann-Whitney の U 検定).
 20% BMP 80% egg PC: 20% BMP 含有 egg PC リポソーム. egg PC: egg PC リポソーム. リン脂質濃度: 500 μM . 泳動緩衝液: リン酸ナトリウム緩衝液 (50 mM, pH 7.4) または クエン酸ナトリウム緩衝液 (55 mM, pH 5.0). 注入電圧: +7 kV (外水相 pH 7.4) または +4 kV (外水相 pH 5.0). 注入時間: 100 秒 (外水相 pH 7.4) または 180 秒 (外水相 pH 5.0). 他の HPCE/FA 条件は Fig. 15 に同じ.

小括

BMP が PRO とリン脂質膜との親和性を増強させることが明らかとなった。また、その効果が PG とほぼ同等であることも判明した。さらに、BMP と PRO との結合に、PRO の正電荷とリン酸基の負電荷との間の静電相互作用が寄与していることが示唆された。一方、酸性オルガネラの内腔のような酸性環境下においては、PRO の分子形分率が低下するために疎水性相互作用が減弱し、PRO とリン脂質二分子膜との間の親和性が低下する可能性が示唆された。後期エンドソームやリソソームは、内水相が酸性であることによって CAD を集積しやすいが、それらのリン脂質二分子膜に BMP が多く含まれていることによって、CAD の集積性がさらに高まることが示唆された。

第3章 DIPLの発症予測のためのバイオマーカーの探索

前章の結果から、BMPはCADとリン脂質との結合を増強することが明らかとなった。BMPは、DIPLの発症部位である後期エンドソームおよびリソソームに高濃度に含有されているリン脂質であるとともに、肺動脈内皮由来の培養細胞⁶⁶⁾や尿中⁵¹⁾でのBMPの含有量が、CAD処置時に増加することが明らかになっている。したがって、DIPLのバイオマーカーとしてのBMPの有用性が示唆されている^{68,69)}。しかし、現在、臨床における、DIPLの確定診断には、組織生検によるラメラ体の確認以外に方法が無い。もし、生検に代わってバイオマーカーが利用できれば、診断のみならず、発症の予測や創薬段階での毒性試験等にも役立つことが期待されるため、これまで、いくつかのバイオマーカーに関する研究が実施されている。例えば、前述のBMP以外にも、フェニルアセチルグリシン⁴⁶⁾、シトクロムP450等の遺伝子群の変異^{47,48)}等がバイオマーカーとなり得る可能性が示唆されている。しかしながら、これらはリン脂質とは全く異なる化合物であり、DIPLの発症メカニズムとの関連性が明らかではなく、DIPL発症に伴う何らかの代償反応により生じたサロゲートマーカーである可能性が否定できない。仮にそうであれば、DIPLとは異なる別の症状においても陽性反応が生じることも想定されるため、DIPLへの特異性を十分に確認する必要がある。一方、BMPはそれ自身がリン脂質であることから、DIPLのエンドポイントに近いと考えられ、DIPLに特異的なバイオマーカーとなり得ることが期待される。しかし、BMPは、体内における含量が微量であるため、高感度かつ高精度な分析が容易とは言えない。

そこで本章では、CAD処置前後における、培養細胞のリン脂質組成をLC-MS/MSを用いて分析し、DIPLに特徴的な変化を探索することで、より分析が容易で、高感度、高精度に分析できるリン脂質バイオマーカー候補物質の探索を行った。

実験方法

(1) 試薬

Tamoxifen (TAM) citrate salt (> 99%), warfarin (WF) sodium salt (> 97%), imipramine (IMI) hydrochloride (> 98%), methanol (LC-MS), 25% ammonia solution (特級), RPMI1640 および BSA は, 和光純薬工業より購入した. CPZ hydrochloride (> 98%), amiodarone (AM) hydrochloride (> 98%) および ammonium formate (97%) は, Sigma-Aldrich より購入した. 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC, > 99%) および 1,2-didecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DDPC, > 99%) は, 日油より購入した. 1,2-Diheptadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DHPC, > 99%) は, Avanti Polar Lipids より購入した. Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA-2Na, > 99.5%) は, 同仁化学研究所 (益城, 熊本, 日本) より購入した. DiI-C18 は Invitrogen より購入した. なお, 本実験で使用した試薬および薬物を, Fig. 23 に示す.

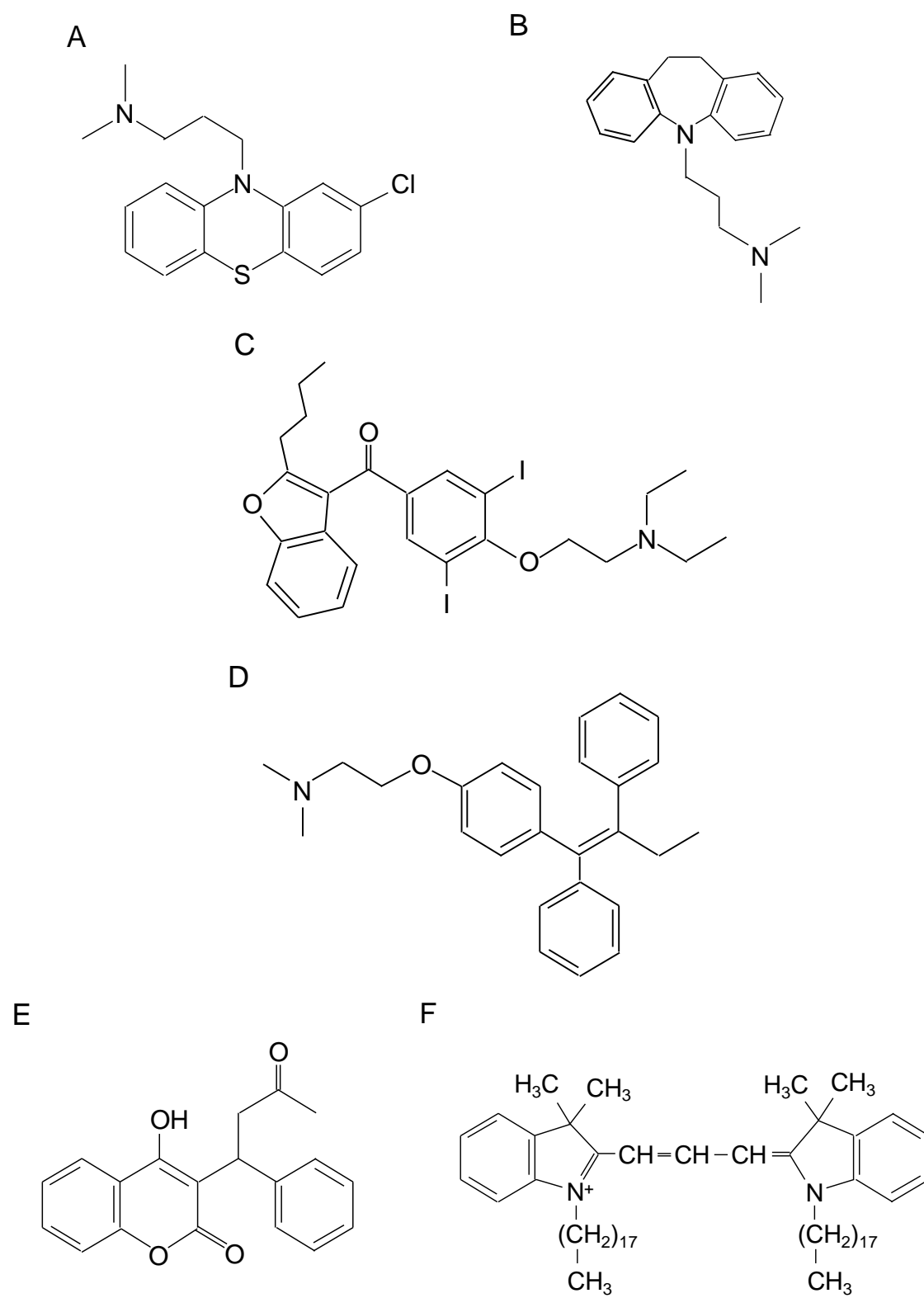


Fig. 23 第3章に使用した試薬および薬物

A:CPZ, B:IMI, C:AM, D:TAM, E:WF, F:DiI-C18.

(2) 細胞培養

細胞は、RAW264 細胞、U-937 細胞および THP-1 細胞を選択し、理化学研究所バイオリソースセンターより購入した。培養は、第 1 章に関する実験 (2) 細胞培養と同様の方法で行った。

(3) 試料調製

細胞を、培養皿からシリコンスクレイパーで剥離後回収し、遠心分離により培養液を除去した後、生理食塩水で懸濁した。細胞懸濁液からの脂質抽出方法は、第 1 章実験方法 (5) と同様の方法で、Folch 法を参考に行った⁵⁵⁾。得られた脂質抽出物をイソプロパノール：メタノール (2:1) 溶液に溶解し、分析試料とした。細胞懸濁液を、-30 °Cで一晩保存したところ、リン脂質組成に変化が生じたため、細胞懸濁液の回収から分析までを同日中に行った。

(4) LC-MS/MS を用いたリン脂質の分析

分析には、Quattro Premier 三連四重極型質量分析計を連結した、2795型高速液体クロマトグラフ (Waters, Milford, MA, USA) を用い、分析条件は、Table 3に示した。選択反応モニタリング (selective reaction monitoring : SRM) の条件として、PCはプロトン付加体のホスホコリン (質量電荷比, m/z 184.1) をproduct ionに設定した。PEおよびPSは、それぞれプロトン付加体のホスホエタノールアミン (m/z 141) およびホスホセリン (m/z 185) を、PIおよびPGはそれぞれアンモニウム付加体のホスホイノシトール (m/z 277) およびホスホグリセロール (m/z 189) をneutral lossとして設定した (Table. 4)。極性頭部の異なるリン脂質クラス毎に、測定対象となる約50種類の m/z 値のチャンネルを設定し (Table 5)，それらが抽出物中に検出されるか予め検討した。その後、実際にピークが検出された約20種のチャンネルについて、極性頭部の異なるリン脂質クラスごとに一斉分析を行った。得られたピーク面積の総和をリン脂質クラス別に求め、それらの値に対する個々のピークの占める割合を算出した。

Table 3 LC-MS/MS を用いたリン脂質分析の条件

カラム	Xterra MS C8 (3 cm x 2.1 mm ID, 3.5 μ m)
移動相	A: メタノール, B: 10 mM ギ酸アンモニウム
流速	0.3 mL/min
グラジエント	0 分: 70%A 1.5 分: 90%A 15 分: 90%A 16.5 分: 70%A
カラム温度	40 $^{\circ}$ C
注入量	5 μ L
スプレー電圧	+3 kV
コリジョン	40 eV

Table 4 SRM の質量数遷移

リン脂質 クラス	<i>m/z</i>	
	プリカーサーイオン	プロダクトイオン
PC	分子量+1	184.1
PE	分子量+1	分子イオン-141
PS	分子量+18	分子イオン-185
PI	分子量+18	分子イオン-277
PG	分子量+18	分子イオン-189

Table 5 本実験で使用了質量数遷移

PC			PE		
fatty acyl chain	<i>m/z</i>		fatty acyl chain	<i>m/z</i>	
	precursor ion MW+H	product ion		precursor ion MW+H	product ion MW+H-141
20:0	566.3	184.1	32:0	692.5	551.5
28:0	678.5	184.1	34:3	714.5	573.5
32:0	734.6	184.1	34:2	716.5	575.5
34:3	756.6	184.1	34:1	718.5	577.5
34:2	758.6	184.1	34:0	720.5	579.5
34:1	760.6	184.1	36:5	738.5	597.5
34:0	762.6	184.1	36:4	740.5	599.5
36:5	780.5	184.1	36:3	742.5	601.5
36:4	782.6	184.1	36:2	744.5	603.5
36:3	784.6	184.1	36:1	746.6	605.6
36:2	786.6	184.1	36:0	748.6	607.6
36:1	788.6	184.1	38:6	764.5	623.5
36:0	790.6	184.1	38:5	766.5	625.5
38:6	806.6	184.1	38:4	768.5	627.5
38:5	808.6	184.1	38:3	770.6	629.6
38:4	810.6	184.1	38:2	772.6	631.6
38:3	812.6	184.1	38:1	774.6	633.6
38:2	814.6	184.1	40:9	786.5	645.5
38:1	816.6	184.1	40:8	788.5	647.5
40:9	828.5	184.1	40:7	790.5	649.5
40:8	830.6	184.1	40:6	792.5	651.5
40:7	832.6	184.1	40:5	794.6	653.6
40:6	834.6	184.1	40:4	796.6	655.6
40:5	836.6	184.1	40:2	800.6	659.6
40:4	838.6	184.1	40:1	802.6	661.6
40:2	842.6	184.1	42:12	808.5	667.5
40:1	844.6	184.1	42:11	810.5	669.5
42:12	850.5	184.1	42:10	812.5	671.5
42:11	852.6	184.1	42:9	814.5	673.5
42:10	854.6	184.1	42:8	816.6	675.6
42:9	856.6	184.1	42:7	818.6	677.6
42:8	858.6	184.1	42:6	820.6	679.6
42:7	860.6	184.1	42:5	822.6	681.6
42:6	862.6	184.1	42:4	824.6	683.6
42:5	864.6	184.1	42:3	826.6	685.6
42:4	866.7	184.1	42:2	828.6	687.6
42:3	868.7	184.1	42:1	830.7	689.7
42:2	870.7	184.1	44:12	836.5	695.5
42:1	872.7	184.1	44:11	838.5	697.5
44:12	878.6	184.1	44:10	840.5	699.5
44:11	880.6	184.1	44:9	842.6	701.6
44:10	882.6	184.1	44:8	844.6	703.6
44:9	884.6	184.1	44:7	846.6	705.6
44:8	886.6	184.1	44:6	848.6	707.6
44:7	888.6	184.1	44:5	850.6	709.6
44:6	890.7	184.1	44:4	852.6	711.6
44:5	892.7	184.1	44:3	854.7	713.7
44:4	894.7	184.1	44:2	856.7	715.7
44:3	896.7	184.1	44:1	858.7	717.7
44:2	898.7	184.1			
44:1	900.7	184.1			

PI			PG		
fatty acyl chain	<i>m/z</i>		fatty acyl chain	<i>m/z</i>	
	precursor ion MW+NH ₄	product ion MW+NH ₄ -277		precursor ion MW+NH ₄	product ion MW+NH ₄ -189
32:0	827.6	550.6	32:0	739.5	550.5
34:3	849.5	572.6	34:3	761.5	572.5
34:2	851.6	574.6	34:2	763.5	574.5
34:1	853.6	576.6	34:1	765.6	576.6
34:0	855.6	578.6	34:0	767.6	578.6
36:5	873.5	596.5	36:5	785.5	596.5
36:4	875.6	598.6	36:4	787.5	598.5
36:3	877.5	600.5	36:3	789.6	600.6
36:2	879.6	602.6	36:2	791.6	602.6
36:1	881.6	604.6	36:1	793.6	604.6
36:0	883.6	606.6	36:0	795.6	606.6
38:6	899.6	622.6	38:6	811.6	622.5
38:5	901.6	624.6	38:5	813.6	624.6
38:4	903.5	626.5	38:4	815.6	626.6
38:3	905.6	628.6	38:3	817.6	628.6
38:2	907.6	630.6	38:2	819.6	630.6
38:1	909.6	632.6	38:1	821.6	632.6
40:9	921.5	644.5	40:9	833.5	644.5
40:8	923.5	646.5	40:8	835.5	646.5
40:7	925.5	648.5	40:7	837.5	648.5
40:6	927.6	650.6	40:6	839.6	650.6
40:5	929.6	652.6	40:5	841.6	652.6
40:4	931.6	654.6	40:4	843.6	654.6
40:2	935.6	658.6	40:2	847.6	658.6
40:1	937.7	660.7	40:1	849.6	660.6
42:12	943.7	666.7	42:12	855.6	666.6
42:11	945.7	668.7	42:11	857.6	668.6
42:10	947.7	670.7	42:10	859.6	670.6
42:9	949.7	672.7	42:9	861.6	672.6
42:8	951.7	674.7	42:8	863.6	674.6
42:7	953.7	676.7	42:7	865.6	676.6
42:6	955.7	678.7	42:6	867.6	678.6
42:5	957.7	680.7	42:5	869.6	680.6
42:4	959.7	682.7	42:4	871.6	682.6
42:3	961.7	684.7	42:3	873.6	684.6
42:2	963.7	686.7	42:2	875.6	686.6
42:1	965.7	688.7	42:1	877.6	688.6
44:12	971.7	694.7	44:12	883.7	694.7
44:11	973.7	696.7	44:11	885.7	696.7
44:10	975.7	698.7	44:10	887.7	698.7
44:9	977.7	700.7	44:9	889.7	700.7
44:8	979.7	702.7	44:8	891.7	702.7
44:7	981.7	704.7	44:7	893.7	704.7
44:6	983.7	706.7	44:6	895.7	706.7
44:5	985.7	708.7	44:5	897.7	708.7
44:4	987.7	710.7	44:4	899.7	710.7
44:3	989.7	712.7	44:3	901.7	712.7
44:2	991.7	714.7	44:2	903.7	714.7
44:1	993.7	716.7	44:1	905.7	716.7

PS

fatty acyl chain	<i>m/z</i>	
	precursor ion MW+H	product ion MW+H-185
32:0	735.5	550.5
34:3	757.5	572.5
34:2	759.5	574.5
34:1	761.5	576.5
34:0	763.5	578.5
36:5	781.5	596.5
36:4	783.5	598.5
36:3	785.5	600.5
36:2	787.5	602.5
36:1	789.5	604.5
36:0	791.6	606.6
38:6	807.5	622.5
38:5	809.5	624.5
38:4	811.5	626.5
38:3	813.5	628.5
38:2	815.6	630.6
38:1	817.6	632.6
40:9	829.5	644.5
40:8	831.5	646.5
40:7	833.5	648.5
40:6	835.5	650.5
40:5	837.5	652.5
40:4	839.5	654.5
40:2	843.6	658.6
40:1	845.6	660.6
42:12	851.5	666.5
42:11	853.5	668.5
42:10	855.5	670.5
42:9	857.5	672.5
42:8	859.5	674.5
42:7	861.5	676.5
42:6	863.6	678.6
42:5	865.5	680.6
42:4	867.6	682.6
42:3	869.6	684.6
42:2	871.6	686.6
42:1	873.6	688.6
44:12	879.5	694.5
44:11	881.5	696.5
44:10	883.5	698.5
44:9	885.5	700.5
44:8	887.6	702.6
44:7	889.6	704.6
44:6	891.6	706.6
44:5	893.6	708.6
44:4	895.6	710.6
44:3	897.6	712.6
44:2	899.7	714.7
44:1	901.7	716.7

(5) フローサイトメーターによるリン脂質蓄積量の測定

第1章実験方法(7)と同様の方法で DiI-C18 含有 RPMI1640 培地を作成した。この培地下にある RAW264 細胞に IMI または溶媒を処置し、24 時間経過後に細胞を回収した。回収した細胞を、PBS で懸濁後、ヨウ化プロピジウムを添加し測定試料とした。測定試料を、FACSCalibur HG flow cytometer (BD Biosciences, Sparks, MD, USA) に注入し、DiI-C18 (励起波長, 488 nm, 蛍光波長, 564~606 nm) およびヨウ化プロピジウム (励起波長, 488 nm, 蛍光波長, 650 nm 以上) の蛍光強度をそれぞれ測定した。データの解析時に、ヨウ化プロピジウムで染色された死細胞を除外し、生細胞のみで DiI-C18 の蛍光強度を評価した。

第 1 節 CAD の細胞内リン脂質組成に及ぼす影響

実験結果・考察

(1) LC-MS/MS を用いたリン脂質分析法の評価

本論文における，リン脂質の表記方法は，Liebisch 等の LIPID MAPS nomenclature⁷⁰⁾ に従った．例えば，細胞内に最も多く存在する PC である 1-パルミトイル 2-オレオイル PC は，パルミトイル部分が炭素数 16，不飽和結合数 0，オレオイル部分が炭素数 18，不飽和結合数 1 であるため，アシル鎖部分の総炭素数と不飽和結合数を用いて PC 34:1 または PC 16:0_18:1 と表記した．また，SRM の質量数遷移の表記方法は，プリカーサーイオンの m/z > プロダクトイオンの m/z とした．つまり，PC 34:1 (分子量，759.6) であれば，プリカーサーイオンは m/z 760.6，プロダクトイオンは m/z 184.1 であることから，760.6 > 184.1 と表記した．この例であれば，総炭素数：二重結合数が 34:1 となる PC のアシル鎖の組み合わせは，最も代表的なパルミトイル基-オレオイル基以外にも考えられる．今回の方法では，同一の質量数遷移を与える分子の識別は HPLC の分離に依存する．

まず，標品として DDPC (PC 10:0_10:0)，DMPC (PC 14:0_14:0) および DHPC (PC 17:0_17:0) を用いて，本分析方法の妥当性を検討した．各リン脂質 0.125 μM を分析した時に得られたクロマトグラムおよび，DHPC と DMPC の再構成イオンクロマトグラム (RIC) を，Fig. 24A に示した．その結果，3 本のピークは各リン脂質に対応し，DDPC と DHPC は，分離検出できていることが確認できた．一方，分子量の近い DMPC と DHPC はピーク下部に重複が認められ，完全には分離していないことが明らかとなった．培養細胞由来の試料には，分子量の近いリン脂質が多種含まれていると考えられ，このように分離が不十分であれば，イオン化の抑制が生じる可能性が考えられる．そこで次に，分離が不十分であることが，定量性に影響するか否か検討した．DMPC (0.19 μM) に，濃度の異なる DHPC (0.063~0.19 μM) をそれぞれ混合した試料を同様に分析した．得られたピーク面積の比と濃度比との関係を Fig. 24B に示す．ピーク面積比と濃度比との間に良好な直線性 ($r = 0.979$) が認められ，傾きは 1.076 であった．このことから，今回の分析に，溶出時間の重なりによるイオン化の抑制が，影響しないことが示唆された．さらに，本実験では，同一試料を各 6 回分析し，試料は 20 $^{\circ}\text{C}$ のオートサンプラー内で測定終了まで 12 時間待機していたが，

各濃度でのピーク面積比の変動係数は、全て 9%未満であったことから、前処理後の試料が、少なくとも 12 時間は安定であることが示唆された。

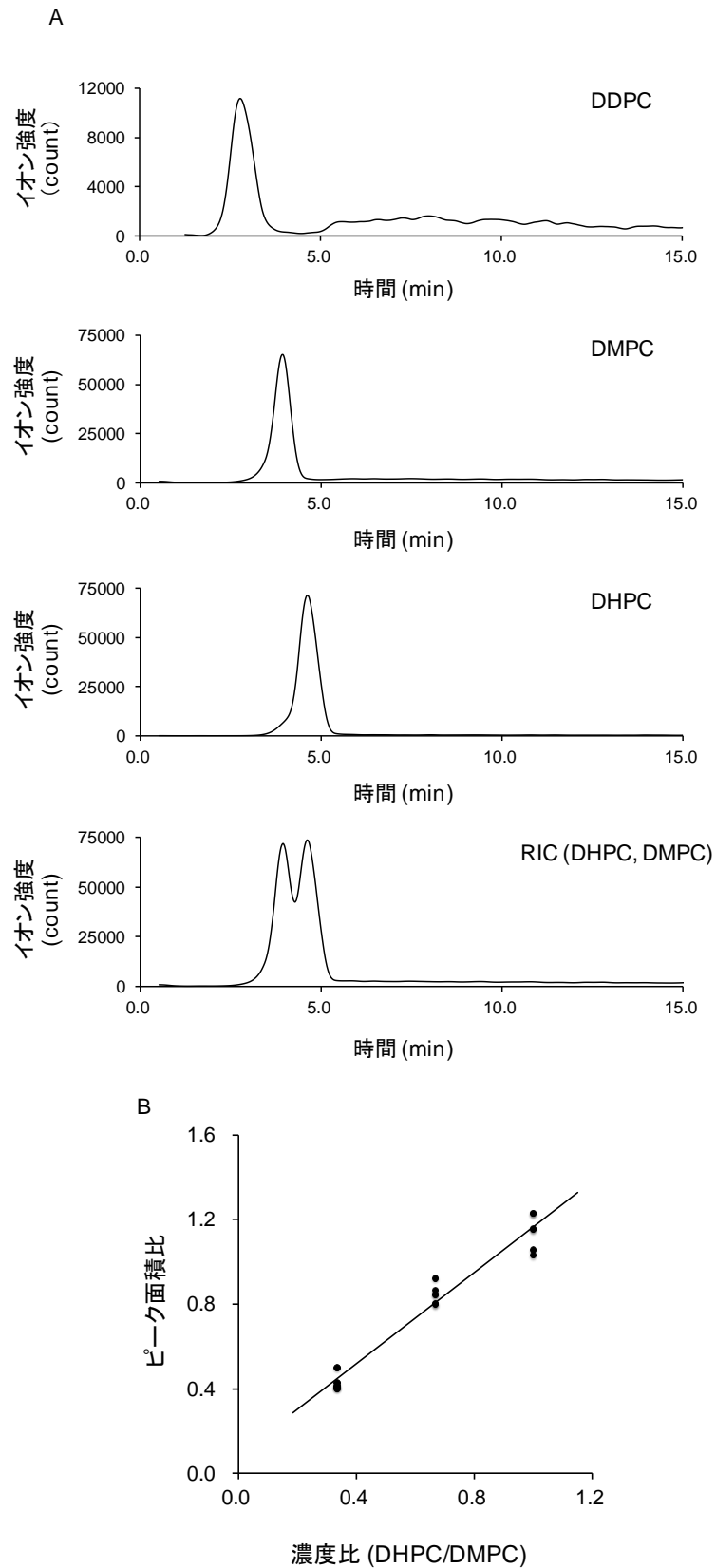


Fig. 24 標準品分析時に得られたクロマトグラム(A)および DHPC と DMPC の RIC(B)

(A)リン脂質濃度:0.125 μM , DDPG (566.3 > 184.1), DMPC (678.5 > 184.1), DHPC (762.6 > 184.1), (B) DHPC (0.063~0.19 μM) および DMPC (0.19 μM), $r = 0.979$.

次に、LC-MS/MS を用いて、細胞内のリン脂質を分析した。測定試料として、RAW264 細胞から Folch 法により抽出した脂質画分を使用した。Fig. 25 には、分析で得られたクロマトグラムを示す。PI 38:4 (903.5 > 626.5) および PI 38:3 (905.6 > 628.6) では、一本のピークが検出され、得られたピーク幅は、標品の分析で得られたピーク幅とほぼ同等であった。一方、PC 38:2 (814.6 > 184.1) では、溶出時間の異なる複数のピークが検出された。このことから、PC 38:2 が、複数の組み合わせのアシル鎖から構成されている可能性が考えられた。

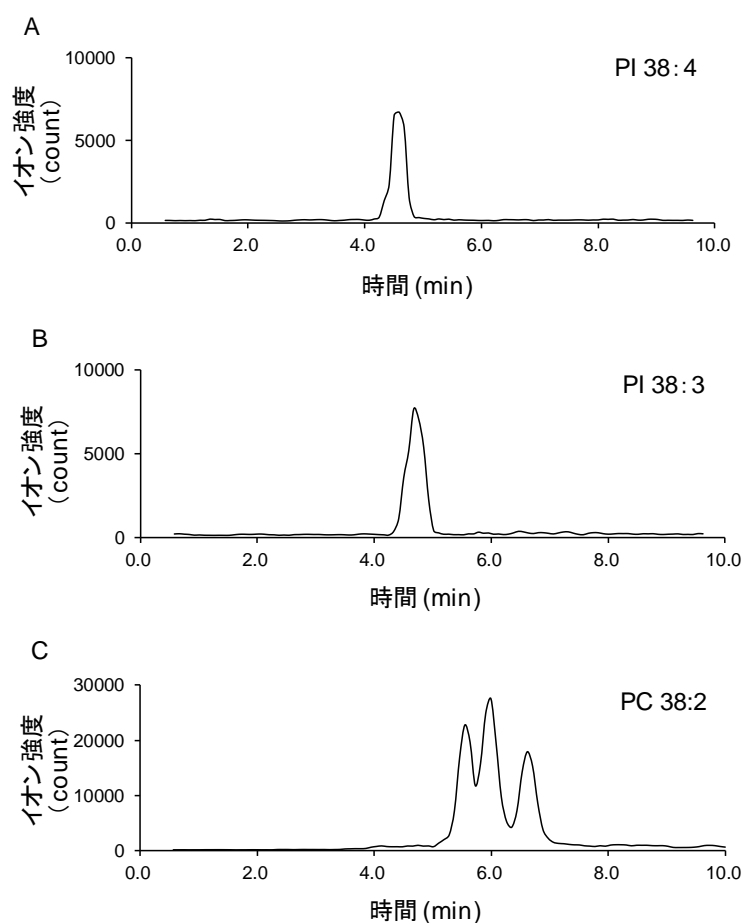


Fig. 25 RAW264 細胞の脂質抽出物から得られたクロマトグラムの例
A:PI 38:4 (903.5 > 626.5), B:PI 38:3 (905.6 > 628.6), C:PC 38:2 (814.6 > 184.1).

(2) 細胞抽出物中に含まれるリン脂質の分析

薬物を処置していない RAW264 細胞から抽出した脂質画分において、リン脂質分子種の組成を極性頭部の異なるリン脂質クラス毎に検討した。算出した RAW264 細胞中の各リン脂質クラスの組成を Fig. 26 に示す。PC および PE は、構成するアシル鎖はおもに 34:2, 34:1, 36:2 および 36:1 であった。この結果は、ラットの肝において、PC および PE を構成する脂肪酸として、FA 16:0, FA 18:0, FA 18:1, および FA 18:2 が多く含まれていること⁶³⁾と一致していた。また、PS では 34:2, 34:1, 36:2 および 36:1 に加え、不飽和結合を複数持つ 40:6, 40:5 および 40:4 が比較的多く含まれていた。これは、ヒト臍帯静脈内皮細胞において PS を構成するアシル鎖に、18:0_18:1, 18:0_18:2, 18:0_22:5 および 18:0_22:6 の組み合わせが多いという過去の報告⁷¹⁾と一致していた。さらに、PG では、おもに 32:0 が含まれていることがわかった。一方、PI の構成アシル鎖はおもに 36:1, 36:2, 38:3 および 38:4 であり、他のリン脂質種とは異なることが明らかとなった。過去の報告においても、RAW264 細胞の PI を構成するアシル鎖が 36:1, 36:2, 38:3 および 38:4 であることが示されており⁷²⁾、今回の結果はこの報告と一致していた。

(3) CAD のリン脂質組成に及ぼす影響

次に、CAD 処置によって、リン脂質の組成に変化が生じるか否かについて検討した。CAD および非 CAD を 24 時間処置した RAW264 細胞から抽出した脂質画分を測定試料とした。CAD として、CPZ (10 μ M), IMI (50 μ M), AM (10 μ M) および TAM (10 μ M) を、非 CAD として WF (100 μ M) を使用した。測定試料を LC-MS/MS を用いて同様に分析した結果、PC, PE, PS および PG のリン脂質組成は、CAD 処置、非 CAD 処置に関わらず、薬物を処置していない細胞のリン脂質組成 (Fig. 26) と同等であった (データ省略)。一方、Fig. 27 には、PI の分析結果を示した。CAD 処置によって、PI 36:1, PI 36:2 と、PI 38:3, PI 38:4 の組成の大小が、逆転しているように見受けられたのに対し、WF 処置時には認められなかった。そこで、主成分分析によって、これら 4 種の PI が CAD 処置によって変化しているかどうか確認した。結果を Fig. 28 に示す。その結果、PI 36:1, PI 36:2, PI 38:3 および PI 38:4 が、CAD 処置によって大きく変化していることが明らかとなった。また、Fig. 7 で示したとおり、CPZ を 24 時間処置した細胞で、リン脂質の蓄積とラメラ体の形成が確認された。以上の結果から、CPZ 処置によって、リン脂質が過剰蓄積した細胞で、PI 36:1, PI 36:2,

PI 38:3 および PI 38:4 の組成に変化が生じ，その変化が CAD に特異的であることが明らかとなった．

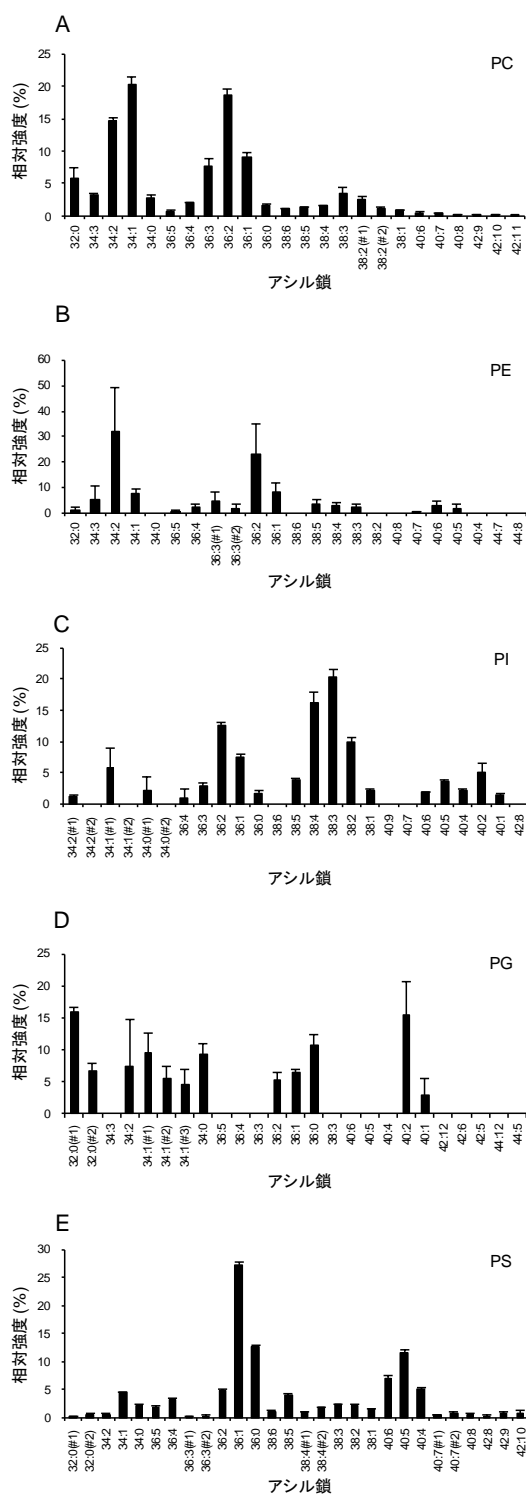


Fig. 26 RAW264 細胞中のリン脂質種ごとの相対含量

平均±標準偏差 ($n = 3$). 縦軸はピーク面積の相対値 (%) であり, すべての和は 100% になる. #1, #2 は, SRM 条件が等しく, 溶出時間の異なるピークを溶出順に表す. A: PC, B: PE, C: PI, D: PG, E: PS.

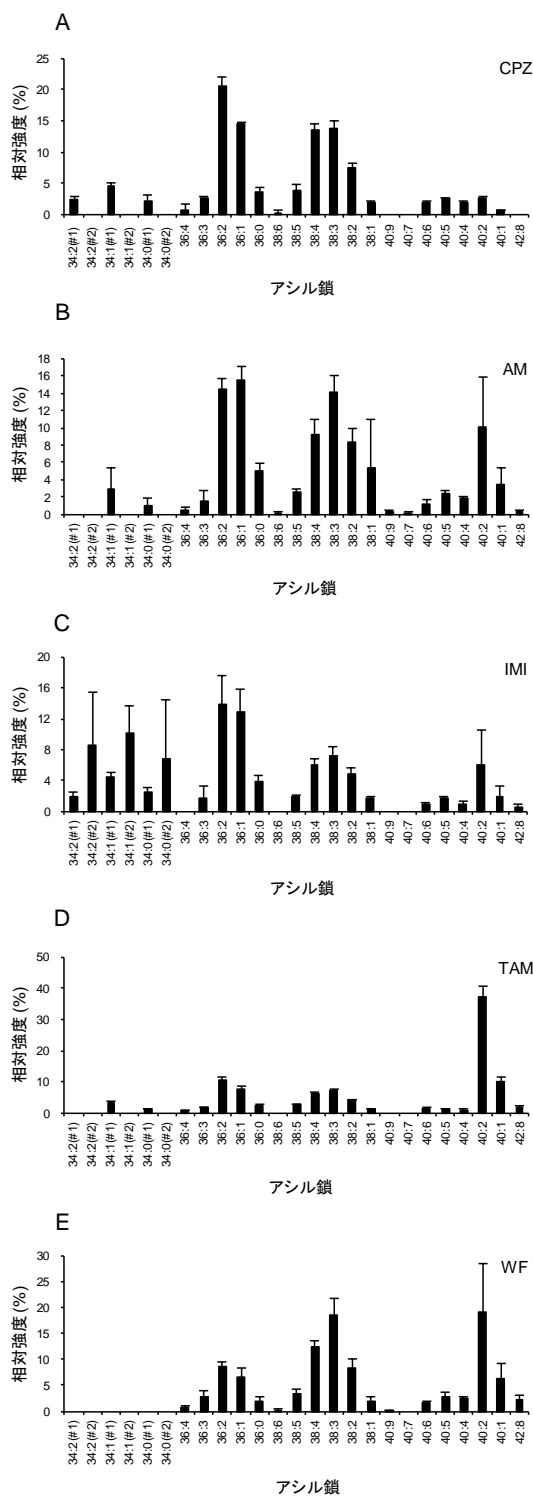


Fig. 27 RAW264 細胞中に CAD を処置した時の PI の相対含量

平均±標準偏差 ($n = 3$). 縦軸はピーク面積の相対値 (%) であり, すべての和は 100% になる. #1, #2 は, SRM 条件が等しく, 溶出時間の異なるピークを溶出順に表す. A: CPZ (10 μ M), B: AM (10 μ M), C: IMI (50 μ M), D: TAM (10 μ M), E: WF (100 μ M).

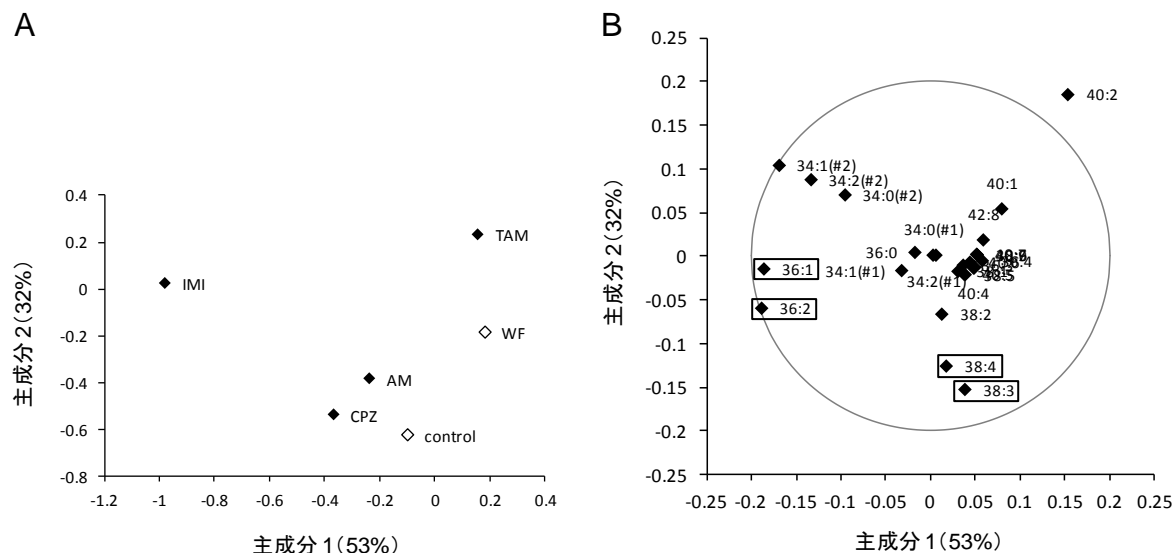


Fig. 28 CAD 処置細胞の PI の組成の主成分分析

A:スコアプロット

B:ローディングプロット. 円 (半径 0.2) は原点からの距離の比較を容易にするために表示.

(4) PI 36:1, PI 36:2, PI 38:3 および PI 38:4 の構造推定

PI 36:1, PI 36:2, PI 38:3 および PI 38:4 を構成するアシル鎖の推定を試みた. RAW264 細胞に CPZ (10 μ M) を 24 時間処置し, 抽出した脂質画分を測定試料とした. LC-MS/MS を用いてプロダクトイオンスキャンを実施し, 得られた product ion のマススペクトルを Fig. 29 に示す. PI 38:4 の分析結果において, FA 20:4 および FA 18:0 に相当する m/z にピークが検出された. 同様に, PI 38:3 では FA 20:3 および FA 18:0 に相当する m/z に, PI 36:2 では, FA 18:0, FA 18:1 および FA 18:2 に相当する m/z に, PI 36:1 では FA 18:0 および FA 18:1 に相当する m/z にそれぞれピークが検出された. なお, その他のアシル鎖の存在を示唆するピークは検出されなかった. 今回の質量分析結果のみでは, 二重結合の位置や幾何異性までは確認できないものの, PI 36:1, PI 36:2, PI 38:3 および PI 38:4 を構成するアシル鎖がステアリン酸 (FA 18:0) であることが示唆された. また, PI 36:1, PI 36:2, PI 38:3 および PI 38:4 のアシル鎖が, それぞれオレイン酸 (FA 18:1), リノール酸 (FA 18:2), エイコサトリエン酸 (FA 20:3) およびアラキドン酸 (FA 20:4) であることも示唆された. さらに, PI 36:2 の一部はオレイン酸二分子から構成されていることが示唆された.

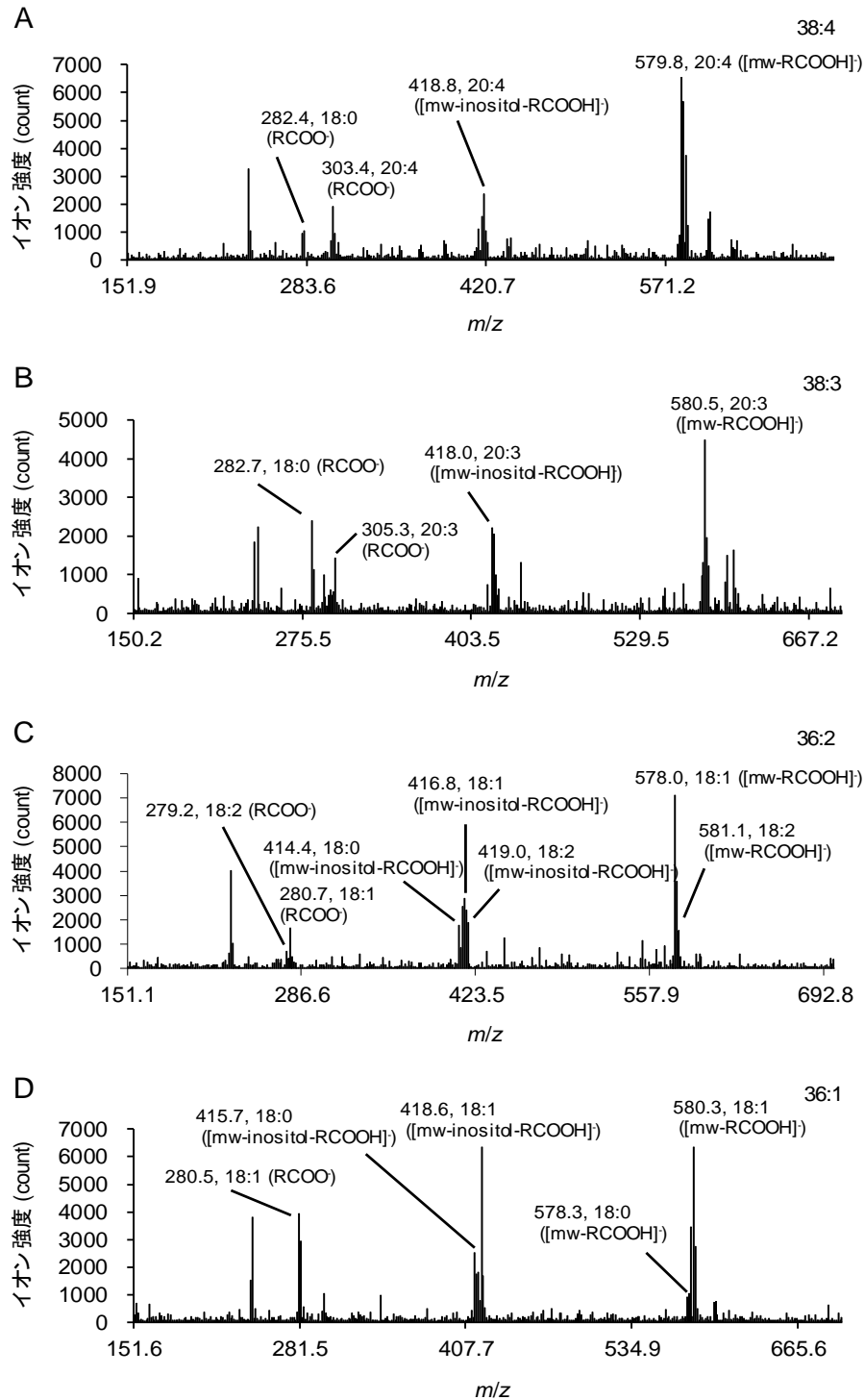


Fig. 29 PI 36:1, PI 36:2, PI 38:3 および PI 38:4 のプロダクトイオンのマスペクトル
 A:PI 38:4(プリカーサーイオン m/z 884.6). B:PI 38:3(プリカーサーイオン m/z 886.6).
 C:PI 36:2(プリカーサーイオン m/z 860.6). D:PI 36:1(プリカーサーイオン m/z 862.6).
 細胞:RAW264. 薬物:CPZ(10 μ M). 処置時間:24 時間. 移動相:メタノールおよび
 0.05% アンモニア水溶液. 注入量:10 μ L. スプレー電圧:-2.8 kV. コリジョン:30 eV.
 他の LC-MS/MS 条件は Table 3 に同じ.

(5) PI 36:1, PI 36:2, PI 38:3 および PI 38:4 の組成変化と含有量の変化との関係

今回の LC-MS/MS による分析方法では、同一の極性頭部を持つリン脂質クラスの中での組成の変動を評価しているため、リン脂質分子種の増減は明らかとなっていない。したがって、本章第 1 節の (3) で観察されたように PI 36:1 と PI 36:2 の組成が増え、PI 38:3 と PI 38:4 の組成が減少したのは、PI 36:1 と PI 36:2 が増加したからなのか、それとも PI 38:3 と PI 38:4 の組成が減少したためなのかは明らかではない。そこで今回、CAD 処置による PI 36:1, PI 36:2, PI 38:3 および PI 38:4 の細胞内含有量の変化を、内標準物質に対する相対定量法により調べた。内部標準物質としては、生体内に存在しない炭素数が 17 個のアシル鎖をもつ DHPC を用いた。CAD として IMI (50 μ M) を処置した RAW264 細胞および、溶媒 (エタノール) を処置した RAW264 細胞 (コントロール) の細胞懸濁液に、DHPC (0.03 mM) を添加後、Folch 抽出により得た脂質画分を測定試料とした。測定試料を LC-MS/MS を用いて分析し、DHPC のピーク面積に対する PI 36:1, PI 36:2, PI 38:3 および PI 38:4 のピーク面積の比をシグナル強度とした。Fig. 30 には、得られたシグナル強度の、コントロール細胞に対する IMI 処置細胞の比を示した。その結果、PI 36:1 および PI 36:2 の含有量は、IMI 処置によって約 2 倍に増加していることが示唆された。一方、PI 38:3 および PI 38:4 の含有量は、変化していないことが示唆された。PI 36:1 および PI 36:2 の含有量は DIPL によって増加する一方、PI 38:3 および PI 38:4 の含有量が一定であったことは、PI 38:3 および PI 38:4 の量が、何らかの制御を受けている可能性を示唆していると考えられる。これは、PI やアラキドン酸が、情報伝達に関与する物質であることに関係しているのかもしれないが、詳細は不明である。

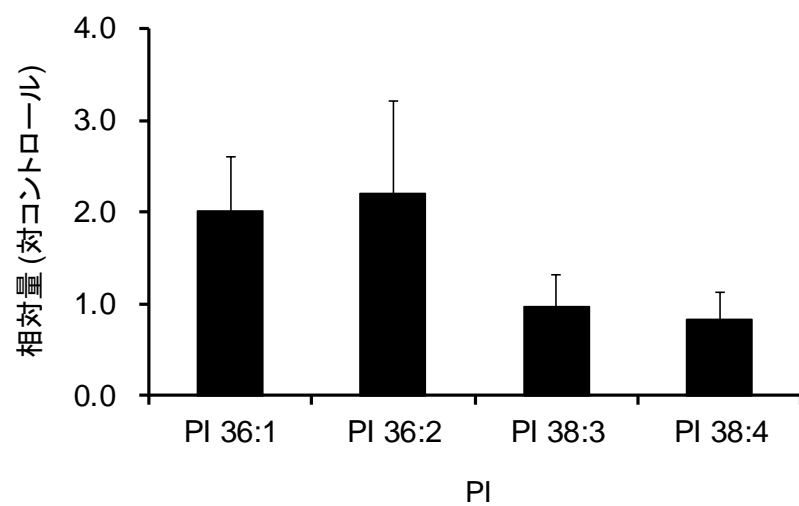


Fig. 30 IMI 処置時の PI の相対含量

平均±標準偏差 ($n = 3$).

細胞:RAW264 細胞, 薬物:IMI (50 μ M), 処置時間:24 時間, 内標準物質:DHPC.

第2節 DIPLの新規予測パラメータの構築と基礎的検討

(1) Prediction Parameter (PP) の設定と細胞への適用

PI 36:1, PI 36:2, PI 38:3 および PI 38:4 に認められた組成の変化が, CAD によるリン脂質蓄積に特異的な変化であることが示唆された. そこで, これら 4 種のリン脂質を用いた DIPL の新規予測パラメータ (prediction parameter, *PP*) を次のように設定した.

$$PP = \frac{\text{PI 36:1 と PI 36:2 のピーク面積の和}}{\text{PI 38:3 と PI 38:4 のピーク面積の和}}$$

算出した *PP* の値を Table 6 に示す. RAW264 細胞において, CPZ (10 μ M), IMI (50 μ M), AM (10 μ M) または TAM (10 μ M) を処置することで有意な *PP* 値の上昇が認められた. さらに, ヒト急性単球性白血病由来 THP-1 細胞および, ヒトリンパ腫由来 U-937 細胞を用いて同様の検討を行った. その結果, THP-1 細胞において, CPZ (10 μ M) 処置により, *PP* 値の有意な上昇が認められた. さらに, 有意ではないものの AM (10 μ M) および TAM (10 μ M) 処置によっても *PP* 値に上昇傾向が認められた. 一方, U-937 細胞に CPZ (10 μ M) を処置した場合において, *PP* 値に変化は認められなかった. DIPL 発症時にリン脂質の蓄積体であるラメラ体は, 単球やマクロファージに認められることが知られている^{5,6)}. 今回検討に用いた細胞の由来がマクロファージ (RAW264) および単球 (THP-1, U-937) であるにもかかわらず, 異なる結果であった. この理由についての詳細は不明であるが, この細胞間での差は, 今回新たに発見した変化をバイオマーカーとして開発する上で重要な情報になると考えられる.

Table 6 薬物処置細胞の PP 値

	RAW264		THP-1		U-937	
	平均±標準偏差	<i>n</i>	平均±標準偏差	<i>n</i>	平均±標準偏差	<i>n</i>
CPZ	1.26 ± 0.08 ^a	7	0.75 ± 0.03 ^a	3	1.07 ± 0.07	3
IMI	2.02 ± 0.25 ^a	3	ND		ND	
AM	1.32 ± 0.16 ^a	7	0.73 ± 0.17	3	ND	
TAM	1.41 ± 0.07 ^a	6	0.69 ± 0.12	3	ND	
WF	0.48 ± 0.03	3	ND		ND	
control	0.54 ± 0.09	15	0.61 ± 0.10	9	1.00 ± 0.04	3

a: $p < 0.01$ (vs コントロール, Mann-Whitney の *U* 検定)

ND: データなし

処置濃度: CPZ (10 μ M), AM (10 μ M), TAM (10 μ M), IMI (50 μ M), WF (100 μ M)

(2) リン脂質蓄積量と *PP* の CAD 濃度依存性との関係

各濃度の IMI を 24 時間処置した細胞内のリン脂質量を、フローサイトメーターを用いた分析により測定し、細胞内のリン脂質蓄積量を評価した。結果を Fig. 31A に示す。IMI 25, 50 μM ではリン脂質量が増加したが、100 μM で減少していることが示唆された。一般に、セルベースアッセイの欠点として、薬物の毒性が測定に影響しやすいことが挙げられている⁷³⁾。100 μM の IMI を処置した細胞において、減少した理由は不明であるが、死細胞の割合が 25 μM および 50 μM 処置ではそれぞれ約 4%, 14%であったのに対し、100 μM 処置では約 52%まで増加したと関係している可能性が考えられる。つまり、ヨウ化プロピジウムでは染色されていないが、IMI の毒性により衰弱した細胞の割合が増加することによって、正確な測定が困難となっている可能性がある。

次に、薬物濃度を変化させることで、細胞への影響を変化させた時に、*PP* 値に変化が生じるか否かについて検討した。濃度の異なる IMI (25, 50, 100 μM) を RAW264 細胞に 24 時間処置した後、脂質を抽出し測定試料とした。LC-MS/MS を用いて測定試料を分析し、得られた結果から *PP* 値を算出した。算出した *PP* 値と濃度との関係を Fig. 31B に示した。IMI 濃度の上昇に伴い、*PP* 値に上昇傾向が認められ、100 μM で他の濃度よりも高値を示した。この結果は、*PP* 値はリン脂質の蓄積量そのものよりむしろ、CAD による毒性を反映している可能性を示唆するものである。また、IMI 25 μM 処置時には、リン脂質の蓄積が軽度であるにもかかわらず、*PP* 値が 50 μM 処置時とほぼ同等になった。このことから、*PP* 値を用いることで、CAD の毒性を感度よく評価できる可能性が示唆された。以上の結果から、*PP* 値が DIPL の新規予測パラメータとなる可能性が示唆された。

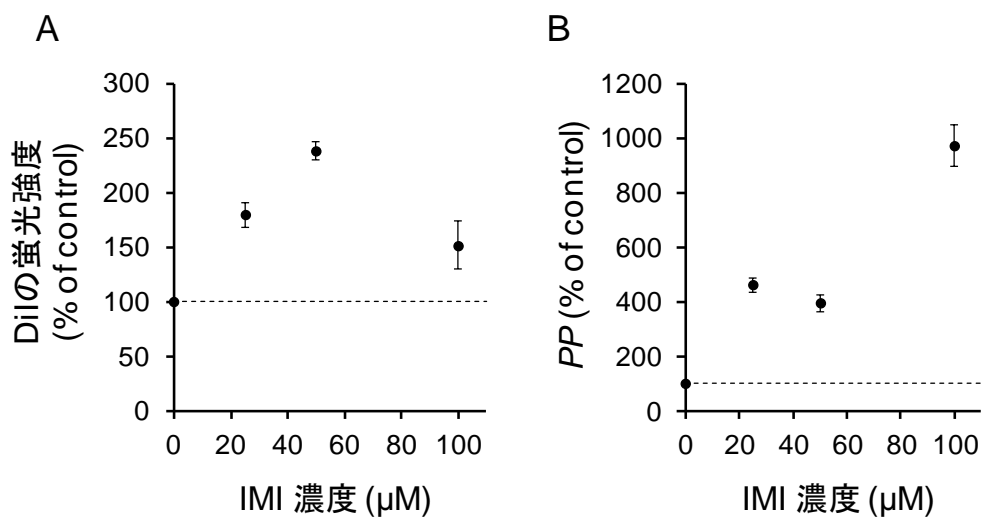


Fig. 31 *PP*とリン脂質蓄積量の濃度依存性

平均±標準偏差 ($n = 3$)

A:細胞内リン脂質量の IMI 濃度依存性

B:*PP* の IMI 濃度依存性

細胞:RAW264 細胞. IMI 濃度:25, 50 および 100 μM . 処置時間:24 時間. リン脂質量は膜染色剤 DiI の蛍光強度で評価(励起波長:488 nm, 蛍光波長:564~606 nm).

小括

CPZ, IMI, AM および TAM 処置によって, 細胞中の PI 36:1 および PI 36:2 の組成が増加し, PI 38:3 および PI 38:4 の組成が減少していることが示唆された. また, IMI 処置によって細胞中の PI 36:1 および PI 36:2 の含有量が増加しているものの, PI 38:3 および PI 38:4 の含有量は変化していないことが示唆された. さらに, LC-MS/MS を用いて, 4 種の PI の構造推定を試みた結果, PI 36:1 は PI 18:0_20:1, PI 36:2 は PI 18:0_18:2 または PI 18:1_18:1, PI 38:3 は PI 18:0_20:3, PI 38:4 は PI 18:0_20:4 である可能性が示唆された.

LC-MS/MS を用いてこれら PI 4 種を分析したピーク面積から DIPL の新規予測パラメータ候補として PP 値を算出した. IMI 濃度とリン脂質量および PP 値との関係を検討した結果, IMI 濃度の上昇に伴い, リン脂質量と PP 値が, ともに増加していることが確認された. このことは, 今回提案したパラメータである, PP が DIPL の予測パラメータとして有用である可能性を示唆している.

総 括

本研究では、細胞の CAD に対するレスポンスに着目し、DIPL 発症メカニズムとバイオマーカーの開発に関して、以下の成果を得た。

1. RAW264 細胞に CPZ を 5 分処置したとき、後期エンドソームおよびリソソーム内の pH は変化しておらず、さらに、リソソーム内のタンパク質分解酵素の活性も低下していないことが明らかとなった。さらに、細胞内にリン脂質および CPZ が高濃度に蓄積した DIPL の様な状態であっても、後期エンドソームおよびリソソーム内の pH が正常な状態に維持されていることが判明した。これらの理由として、CPZ が流入し蓄積することで消費されるプロトンが、pH 維持機構の一つである v-ATPase によって補われていることが示唆された。これらの結果は、CAD による細胞内リン脂質の過剰蓄積に後期エンドソームおよびリソソームの pH が関与していないことを初めて実験的に示したものである。
2. 後期エンドソームおよびリソソームに特異的に存在する BMP が、リン脂質二分子膜と PRO との親和性を増強させることを明らかにした。また、BMP を含有するリン脂質二分子膜と PRO との結合が、リン脂質のリン酸基がもつ負電荷との静電相互作用、およびアシル基との疎水性相互作用によって形成されている可能性が示唆された。このことから、後期エンドソームおよびリソソームの生体膜は BMP を含有しているため、他の生体膜よりも PRO との親和性が高い可能性が示唆された。一方、後期エンドソームおよびリソソームの内水相が酸性環境であることで PRO の分子形分率が低下し、疎水性相互作用が減弱していることが示唆された。後期エンドソームやリソソームは、内水相が酸性であることによって CAD を集積しやすいが、それらのリン脂質二分子膜に BMP が多く含まれていることによって、CAD の集積性がさらに高まる可能性が示唆された。
3. CAD を処置した RAW264 細胞で、特異的に PI 36 : 1 および PI 36 : 2 の占める割合が増加し、PI 38 : 3 および PI 38 : 4 の占める割合が減少していることが明らかになった。この時、PI 36 : 1 および PI 36 : 2 の含有量は増加しているもの

の、PI 38 : 3 および PI 38 : 4 の含有量は変化していないことも判明した。これらの結果から、DIPL の新規予測パラメータとして $PP = (\text{PI } 36 : 1 \text{ と PI } 36 : 2 \text{ のピーク面積の和}) / (\text{PI } 38 : 3 \text{ と PI } 38 : 4 \text{ のピーク面積の和})$ を提案した。IMI 処置濃度を変化させた場合の PP とリン脂質の蓄積との関係性を評価した結果、IMI 濃度の上昇に伴い、リン脂質量と PP 値が、ともに増加していることが確認された。このことは、今回提案したパラメータである PP が DIPL のバイオマーカーとなる可能性を示唆している。

以上得られた成果は、DIPL 発症メカニズムを解明するための基礎的な知見となるものである。また、提案したパラメータの動物、ヒトへの応用について今後さらに検討することで、臨床で有用なバイオマーカーとなることが期待される。

謝 辞

本研究を行うにあたり、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜り、本論文をまとめるに際して、親身な御助言、力強い励ましを頂きました武庫川女子大学薬学部 谷本敏子 教授に深く感謝し、心より御礼を申し上げます。

本研究の遂行における全般を通じて、研究者としての心構え、研究に対する取り組み方、その他、全てに有益なる御指導と御鞭撻を賜り、本論文をまとめるに際しては、御懇切なる御指導と御助言を賜りました武庫川女子大学薬学部 黒田幸弘 准教授に深謝し、厚く御礼申し上げます。

本論文の作成にあたり、本論文を御精読頂くとともに御精査を賜り、有益な御助言と温かい御指導を賜りました 武庫川女子大学薬学部 萩中淳 教授ならびに 森山賢治 教授に深謝致します。

本研究において、リポソームの粒子径を測定するにあたり、御協力賜りました、京都大学薬学部 石濱泰 教授ならびに富山大学薬学部 中野実 教授に深く感謝致します。

本研究の、質量分析に関して、御協力頂きました、武庫川女子大学薬学部 竹山志朱代 助教に深謝致します。

本研究において、電子顕微鏡画像の撮影に際し、御協力頂きました、独立行政法人医薬基盤研究所共用器機実験室 赤木謙一 博士ならびに 物部容子 氏に深く感謝致します。

さらに、数々のご配慮を頂くとともに、御支援、御協力を賜りました、武庫川女子大学薬学部薬品物理化学研究室の皆様にも厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究を遂行するにあたり、物心両面において支援してくれた、家族に感謝致します。

引用文献

- 1) Kodavanti U.P., Mehendale H.M., *Pharmacol. Rev.*, **42**, 327-354 (1990).
- 2) 日本トキシコロジー学会教育委員会 [編集], *新版トキシコロジー*, 朝倉書店 (2009).
- 3) 上野脩幸, 渡辺牧夫, 林暢紹, 福島敦樹, 矢生健一, *眼科*, **50**, 951-957 (2008).
- 4) Schmitz G., Grandl M., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1791**, 524-539 (2009).
- 5) Perico M.E., Crivellente F., Faustinelli I., Suozzi A., Cristofori P., *Cell Biol. Toxicol.* **25**, 587-598 (2009).
- 6) Halstead B.W., Zwickl C.M., Morgan R.E., Monteith D.K., Thomas C.E., Bowers R.K., Berridge B.R., *J. Appl. Toxicol.*, **26**, 169-177 (2006).
- 7) Zheng N., Zhang X., Rosania G.R., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **336**, 661-671 (2011).
- 8) 河野望, 井上貴雄, 新井洋由, *生化学*, **83**, 462-474 (2011).
- 9) Kobayashi T., Stang E., Fang K.S., de Moerloose P., Parton R.G., Gruenberg J., *Nature*, **392**, 193-197(1998).
- 10) Kobayashi T., Startchev K., Whitney A.J., Gruenberg J., *Biol. Chem.*, **382**, 483-485 (2001).
- 11) Schulze H., Kolter T., Sandhoff K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1793**, 674-683 (2009).
- 12) Thornburg T., Miller C., Thuren T., King L., Waite M., *J. Biol. Chem.*, **266**, 6834-6840 (1991).
- 13) Mettlen M., Loerke D., Yarar D., Danuser G., Schmid S.L., *J. Cell. Biol.*, **188**, 919-933 (2010).
- 14) Harding C., Heuser J., Stahl P., *J. Cell. Biol.*, **97**, 329-339 (1983).
- 15) Ramachandran R., *Semin. Cell Dev. Biol.*, **22**, 10-17 (2011).
- 16) Vandoorne K., Addadi Y., Neeman M., *Angiogenesis*, **13**, 75-85 (2010).
- 17) Hiraoka M., Abe A., Lu Y., Yang K., Han X., Gross R.W., Shayman J.A., *Mol. Cell Biol.*, **26**, 6139-6148 (2006).
- 18) Paroutis P., Touret N., Grinstein S., *Physiology*, **19**, 207-215 (2004).
- 19) Mindell J.A., *Annu. Rev. Physiol.*, **74**, 69-86, (2012).
- 20) Graves A.R., Curran P.K., Smith C.L., Mindell J.A., *Nature*, **453**, 788-792 (2008).
- 21) Kornak U., Kasper D., Bösl M.R., Kaiser E., Schweizer M., Schulz A., Friedrich W., Delling G., Jentsch T.J., *Cell*, **104**, 205-215 (2001).
- 22) Hackam D.J., Rotstein O.D., Zhang W.J., Demareux N., Woodside M., Tsai O., Grinstein S., *J. Biol. Chem.*, **272**, 29810-29820 (1997).
- 23) Nakamura N., Tanaka S., Teko Y., Mitsui K., Kanazawa H., *J. Biol. Chem.*, **280**, 1561-1572 (2005).
- 24) Morissette G., Ammoury A., Rusu D., Marguery M.C., Lodge R., Poubelle P.E., Marceau F., *Br. J. Pharmacol.*, **157**, 1531-1540 (2009).

- 25) Ishizaki J., Yokogawa K., Ichimura F., Ohkuma S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **294**, 1088-1098 (2000).
- 26) Hollemans M., Elferink R.O., de Groot P.G., Strijland A., Tager J.M., *Biochim. Biophys. Acta*, **643**, 140-151 (1981).
- 27) Duvvuri M., Krise J.P., *Mol. Pharm.*, **2**, 440-448 (2005).
- 28) Ohkuma S., Poole B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **75**, 3327-3331 (1978).
- 29) Tietz P.S., Yamazaki K., LaRusso N.F., *Biochem. Pharmacol.*, **40**, 1419-1421 (1990).
- 30) Anderson N., Borlak J., *FEBS Lett.*, **580**, 5533-5540 (2006).
- 31) Kuroda Y., Watanabe Y., Shibukawa A., Nakagawa T., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30**, 1869-1877 (2003).
- 32) Kubo M., Gardner M.F., Hostetler K.Y., *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 3761-3765 (1986).
- 33) Ma J.Y., Ma J.K., Weber K.C., *J. Lipid Res.*, **26**, 735-744 (1985).
- 34) Avdeef A., Box K.J., Comer J.E., Hibbert C., Tam K.Y., *Pharm. Res.*, **15**, 209-215 (1998).
- 35) Franzen U., Jorgensen L., Larsen C., Heegaard N.H., Østergaard, J., *Electrophoresis*, **30**, 2711-2719 (2009).
- 36) Kuroda Y., Saito M., *Toxicol. In Vitro*, **24**, 661-668 (2010).
- 37) Kubo M., Hostetler K.Y., *Biochemistry*, **24**, 6515-6520 (1985).
- 38) Joshi U.M., Kodavanti P.R., Coudert B., Dwyer T.M., Mehendale H.M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **246**, 150-157 (1988).
- 39) Abe A., Shayman J.A., *J. Lipid Res.*, **50**, 2027-2035 (2009).
- 40) Hostetler K.Y., Reasor M.J., Walker E.R., Yazaki P.J., Frazee B.W., *Biochim. Biophys. Acta*, **875**, 400-405 (1986).
- 41) Morissette G., Lodge R., Marceau F., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **228**, 364-377 (2008).
- 42) Shacka J.J., Klocke B.J., Shibata M., Uchiyama Y., Datta G., Schmidt R.E., Roth K.A., *Mol. Pharmacol.*, **69**, 1125-1136 (2006).
- 43) Marceau F., Bawolak M.T., Lodge R., Bouthillier J., Gagné-Henley A., Gaudreault R.C., Morissette G., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **259**, 1-12 (2012).
- 44) Maejima I., Takahashi A., Omori H., Kimura T., Takabatake Y., Saitoh T., Yamamoto A., Hamasaki M., Noda T., Isaka Y., Yoshimori T., *EMBO J.*, **32**, 2336-2347 (2013).
- 45) Kornhuber J., Henkel A.W., Groemer T.W., Städtler S., Welzel O., Tripal P., Rotter A., Bleich S., Trapp S., *J. Cell. Physiol.*, **224**, 152-164 (2010).
- 46) Nicholls A.W., Nicholson J.K., Haselden J.N., Waterfield C.J., *Biomarkers*, **5**, 410-423 (2000).
- 47) Yudate H.T., Kai T., Aoki M., Minowa Y., Yamada T., Kimura T., Ono A., Yamada H., Ohno Y., Urushidani T., *Toxicology*, **295**, 1-7 (2012).
- 48) Hirode M., Ono A., Miyagishima T., Nagao T., Ohno Y., Urushidani T., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **229**, 290-299 (2008).

- 49) Sawada H., Takami K., Asahi S., *Toxicol. Sci.*, **83**, 282-292 (2005).
- 50) Mortuza G.B., Neville W.A., Delaney J., Waterfield C.J., Camilleri P., *Biochim. Biophys. Acta*, **17**, 136-146 (2003).
- 51) Baronas E.T., Lee J.W., Alden C., Hsieh F.Y., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **218**, 72-78 (2007).
- 52) Lin H. J., Herman P., Lakowicz J. R., *Cytometry A*, **52**, 77-89 (2003).
- 53) LeCureux L., Cheng C.S., Herbst J., Reilly T.P., Lehman-McKeeman L., Otieno M., *Toxicol. In Vitro*, **25**, 1934-1943 (2011).
- 54) Haggie P.M., Verkman A.S., *J. Biol. Chem.*, **284**, 7681-7686 (2009).
- 55) Humphries W.H. 4th, Payne C.K., *Anal. Biochem.*, **424**, 178-183 (2012).
- 56) Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H., *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509 (1957).
- 57) Fiske C.H., Subbarow Y., *Science*, **70**, 381-382 (1929).
- 58) Manders E.M.M., Verbeek F.J., Aten J.A., *J. Microsc.*, **169**, 375-382 (1993).
- 59) Ohkuma S., *Methods Enzymol.*, **174**, 131-154 (1989).
- 60) Carlsson S.R., Roth J., Piller F., Fukuda M., *J. Biol. Chem.*, **263**, 18911-18919 (1988).
- 61) Steinberg B.E., Huynh K.K., Brodovitch A., Jabs S., Stauber T., Jentsch T.J., Grinstein S., *J. Cell Biol.*, **189**, 1171-1186 (2010).
- 62) Wiström C.A., Jones G.M., Tobias P.S., Sklar L.A., *Biophys. J.*, **70**, 988-997 (1996).
- 63) 香川靖雄, イラストで見る生体膜と疾患の分子生物学, 南山堂, (1993).
- 64) Kobayashi T., Beuchat M.H., Chevallier J., Makino A., Mayran N., *J. Biol. Chem.*, **277**, 32157-32164 (2002).
- 65) Matsuo H., Chevallier J., Mayran N., Le Blanc I., Ferguson C., Fauré J., Blanc N.S., Matile S., Dubochet J., Sadoul R., Parton R.G., Vilbois F., Gruenberg J., *Science*, **303**, 531-534 (2004).
- 66) Martin W.J. 2nd, Standing J.E., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **244**, 774-779 (1988).
- 67) Moncelli M.R., Becucci L., Guidelli R., *Biophys. J.*, **66**, 1969-1980 (1994).
- 68) Tengstrand E.A., Miwa G.T., Hsieh F.Y., *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **6**, 555-570 (2010).
- 69) Hullin-Matsuda F., Luquain-Costaz C., Bouvier J., Delton-Vandenbroucke I., *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **81**, 313-24 (2009).
- 70) Liebisch G., Vizcaíno J.A., Köfeler H., Trötz Müller M., Griffiths W.J., Schmitz G., Spener F., Wakelam M.J., *J. Lipid Res.*, **54**, 1523-1530 (2013).
- 71) 板部洋之, 蛋白質・核酸・酵素, **38**, 1489-1499 (1993).
- 72) Milne S.B., Ivanova P.T., DeCamp D., Hsueh R.C., Brown H.A., *J. Lipid Res.*, **46**, 1796-1802 (2005).
- 73) Morelli J.K., Buehrle M., Pognan F., Barone L.R., Fieles W., Ciaccio P.J., *Cell Biol. Toxicol.*, **22**, 15-27 (2006).